

**ISOLIERUNG, KULTIVIERUNG
UND EIGENSCHAFTEN VON
PROTOPLASTEN
AUS DAUCUS CAROTA**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
am Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Swetlana Hellmann
aus Berlin

1976

**ISOLIERUNG, KULTIVIERUNG
UND EIGENSCHAFTEN VON
PROTOPLASTEN
AUS DAUCUS CAROTA**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
am Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Swetlana Hellmann
aus Berlin



1. Referent Prof. Dr. J. Reinert
2. Referent Prof. Dr. H.-J. Küster

Letzter Prüfungstag 20.1.1976

INHALT

<u>EINLEITUNG</u>	4
 <u>MATERIAL UND METHODE</u>	
Zellmaterial und Nährmedien	8
Lichtmikroskopische Untersuchungsmethoden	9
Färbungen und Fixierungen	10
 <u>ERGEBNISSE</u>	
<u>A. Isolierung von Protoplasten in Abhängigkeit von</u>	
1. Art, Zustand und "Vorbehandlung" des Gewebes	13
2. Art, Konzentration und Inkubationszeit des Enzyms	19
3. Art und Konzentration des Plasmolytikums	22
4. pH-Wert und Zusammensetzung des Mediums	22
5. Temperatur	23
 <u>B. Kultivierung von Protoplasten</u>	
1. "Waschen" (Entfernen des Enzyms etc.)	24
2. Kulturmedien der Protoplasten	27
3. Kulturbedingungen	27
 <u>C. Eigenschaften von Protoplasten</u>	
(im Vergleich zu Zellen und plasmolysierten Zellen)	
a) Lebensfähigkeit	35
b) Fusionsfähigkeit	57
c) Zellwandregenerationsfähigkeit	67
d) Teilungsfähigkeit	77
 <u>DISKUSSION</u>	84
 ZUSAMMENFASSUNG	114
 LITERATURVERZEICHNIS	116

E I N L E I T U N G

=====

Zur Klärung vieler physiologischer, biochemischer und genetischer Probleme erwiesen sich ganze Pflanzen als zu komplex. Daher hatte sich die Forschung immer mehr auf das Studium einzelner Zellen konzentriert. Durch die In-vitro-Kultur konnten viele Eigenschaften isolierter höherer Pflanzenzellen untersucht, sowie ihre Fähigkeit, eine ganze Pflanze zu regenerieren, erfaßt werden (HABERLANDT 1902, WHITE 1934, GAUTHERET 1939, REINERT 1958, BERGMANN 1960 u.a.) Eine Fülle von Problemen ließ sich jedoch nicht klären, da die Zellwand viele Untersuchungen erschwerte oder überhaupt verhinderte.

Mit der Isolierung von Protoplasten, d.h. dem enzymatischen Abbau der Zellwand unter geeigneten osmotischen Bedingungen, (COCKING 1960, TAKEBE et al. 1968 u.a.) eröffnen sich nun neue experimentelle Möglichkeiten (RUESINK 1971, COCKING 1972, GAMBORG et al. 1973, ERIKSSON et al. 1974, BAJAJ 1974).

Zu den wichtigsten zählen die Versuche zur somatischen Hybridisierung, die für die Züchtung und Agrarwirtschaft von großer Bedeutung zu werden versprechen, da möglicherweise auf diesem Wege die Qualität von Nutzpflanzen verbessert werden kann (SCHENK und HILDEBRANDT 1969, NICKELL und TORREY 1969). Durch die Fusion von Protoplasten aus unterschiedlichen Pflanzen versucht man, Inkompatibilitäten zu umgehen und hofft, anschließend Hybriden zu regenerieren, die vorteilhafte Eigenschaften der jeweiligen Pflanzenarten in sich vereinen (POWER et al. 1970, ERIKSSON et al. 1970, POTRYKUS 1971, CARLSON et al. 1972, KAMEYA et al. 1973, KELLER et al. 1973, KAO et al. 1974 u.a.).

Eine Übertragung fremden, genetischen Materials in Protoplasten höherer Pflanzen könnte aber auch in Form von Makromolekülen, Zellorganellen, Viren und Bakterien erfolgen.

Neben DNS, RNS, und Nukleoproteinen (OHYAMA et al. 1972, HESS 1973, HEYN et al. 1973, HOLL et al. 1974 u.a.), Zellkernen (POTRYKUS 1973), Chloroplasten (GILES 1973, CARLSON 1973) und Viren (AOKI et al. 1969, TAKEBE et al. 1973 u.a.) werden Rhizobien (DAVEY et al. 1972 u.a.) direkt von Protoplasten aufgenommen.

Viel diskutiert werden in diesem Zusammenhang Möglichkeiten, die Fähigkeit der Fixierung von Luftstickstoff auf Nutzwund Getreidepflanzen zu übertragen (COCKING 1972, GAMBORG et al. 1973, DAVEY et al. 1974 u.a.).

Genomveränderungen könnten mit hapliden oder isogenen Protoplasten unmittelbar festgestellt werden (NITSCH et al. 1971, BAJAJ 1972, WENZEL et al. 1973).

Neue Möglichkeiten ergeben sich auch auf anderen Gebieten. So tragen Protoplasten zur Bekämpfung von Pflanzenerkrankheiten bei, da wandlose Zellen künstlich leichter infiziert und dadurch Wirt-Parasit-Beziehungen umfangreicher studiert werden können (AOKI et al. 1969, COUTTS et al. 1973, ZAITLIN et al. 1974, TAKEBE et al. 1974 u.a.).

Weiterhin werden Protoplasten zur Klärung bestimmter Struktur- und Funktionsfragen eingesetzt, wie z.B. bei Untersuchungen von Plasmamembranen (COCKING 1961, RUESINK und THIMANN 1965, BOULWARE et al. 1972, BÖRNER 1973, GLIMELIUS et al. 1974, BAYER 1974 u.a.) und bei der Erforschung der Biosynthese der Zellwand (POJNAR et al. 1967, PRAT et al. 1971, WILLISON 1973, BURGESS et al. 1974 u.a.).

Als individuelle Zelleinheiten und mit der Fähigkeit zur Regeneration einer ganzen Pflanze sind Protoplasten besonders geeignete Objekte zum Studium der Morphogenese und pflanzlicher Differenzierungsprozesse (POTRYKUS 1971, TAKEBE et al. 1971, NITSCH 1971, GRAMBOW et al. 1972, DONN et al. 1973, BUI-DANG-HA 1974, WENZEL et al. 1973 u.a.).

Um mit Protoplasten die aufgeführten Probleme bearbeiten zu können, müssen entsprechende Methoden zu ihrer Isolierung und Kultivierung entwickelt werden.

Mit der Gewinnung von Protoplasten haben sich bereits 1892 KLERCKER und 1909 KÜSTER befaßt. Beide haben auf mechanischem Wege versucht, Protoplasten zum Studium von Membraneigenschaften zu isolieren, Protoplasten zum Studium von Membraneigenschaften zu isolieren. Die Anzahl der auf diese Weise gewonnenen Protoplasten ist sehr klein, auf leicht plasmolysierbare Zellen beschränkt und nur durch sehr mühselige Handhabung zu erreichen. Erst 1960 hat die Protoplastenforschung neuen Auftrieb bekommen als es COCKING unter Anwendung von zellwandabbauenden Enzymen (Cellulasen, Pektinasen) gelang, eine beliebige Anzahl von Protoplasten herzustellen (COCKING 1960, 1963, 1966, 1970). 1968 haben dann TAKEBE et al. eine gute Methode der Trennung von Tabakmesophyllzellen mit anschließender Protoplastenisolierung durch kommerzielle Enzympräparate veröffentlicht.

Inzwischen sind aus zahlreichen Pflanzen (Tomate, Tabak, Mais, Hafer, Petunie, Karotte und vielen anderen) Protoplasten sowohl aus ganzen Organen wie auch aus Kalluskulturen isoliert worden (ERIKSSON et al. 1969, OTSUKI et al. 1969, RAJ et al. 1969, CHUPEAU und MOREL 1970, BAWA und TORREY 1971, TAIZ und JONES 1971, POTRYKUS 1971, HELLMANN und REINERT 1971, MOTOYOSHI 1971, GAMBORG et al. 1972, GRAMBOW et al. 1972, KAMEYA und UCHIMIYA 1972, KELLER et al. 1973, WALLIN und ERIKSSON 1973, BUTENKO et al. 1973, WATTS et al. 1974, BINDING 1974, MEYER et al. 1975 u.a.).

Trotz gewisser Erfolge sind in der Handhabung der Protoplasten immer noch viele technische Fragen zu lösen (ERIKSSON et al. 1974).

Die vorliegende Arbeit ist während der intensivsten Zeit der Protoplastenforschung begonnen worden und behandelt daher im ersten Teil Probleme, die sich beim Isolieren und Kultivieren von Protoplasten aus *Daucus carota* ergeben haben, im zweiten Teil werden spezielle Eigenschaften dieser Protoplasten, die sich in der Lebensfähigkeit, Regenerations-, Fusions- und Teilungsfähigkeit äußern, näher untersucht.

Tab. 1: Zusammensetzung der Nährmedien M_s (modifiziertes Nährmedium nach MURASHIGE und SKOOG 1962) REINERT et al. (1966) und M_w (Nährmedium nach WHITE 1954).

M_s		M_w	
Salze	mg/l	Salze	mg/l
$MnSO_4 \cdot 2H_2O$	22,300	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	6,60
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	10,600	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2,70
H_3BO_3	6,200	H_3BO_3	1,50
KJ.....	0,830	KJ.....	0,75
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,250		
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025		
$CoCl \cdot 6H_2O$	0,025		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370,000	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	737,50
KNO_3	1900,000	KNO_3	80,00
NH_3NO_3	1650,000	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	288,00
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440,000	KCl.....	65,00
KH_2PO_4	170,000	$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	19,00
		Na_2SO_4	200,00
Na_2-EDTA	37,300		
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,800	$Fe_2(SO_4)_3$	2,60
<u>Organische Zusätze</u>			
Glycin.....3,0 mg/l			
Nicotinsäure....0,5 mg/l			
Pyridoxin HCl...0,5 mg/l			
Thiamin.....0,1 mg/l			
2% Saccharose			
5×10^{-8} g/ml 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure			
0,8% Difco-Agar			

M A T E R I A L u n d M E T H O D E

=====

Zellmaterial und Nährmedien

Für die Isolierung von Protoplasten wurden Kalluskulturen von *D a u c u s c a r o t a* verwendet. Dabei handelte es sich hauptsächlich um einen über sechs Jahre alten Kallusstamm, der mit bis zu sechs Monaten alten Kalluskulturen verglichen wurde.

Einige Versuche wurden entweder mit Embryonen oder Blättern und Wurzeln steriler Pflänzchen, die sich aus Adventivembryonen entwickelt hatten, durchgeführt.

Die Anzucht von Kalluskulturen erfolgte in der bei REINERT (1968) beschriebenen Weise. Nach Oberflächensterilisierung in 9%iger Chlorkalklösung wurden aus dem oberen Drittel der Hauptwurzel der Karotte Explantate (4x4x2mm) mit Teilen von Phloem, Kambium und Xylem unter sterilen Bedingungen ausgeschnitten und auf synthetische Nährmedien übertragen.

Die Nährmedien waren entweder M_w , das aus den Mineralsalzen und organischen Zusätzen nach WHITE (1954), 2% Saccharose, 5×10^{-8} g/ml 2,4-D und 0,8% Agar bestand oder M_s , das sich nur dadurch von M_w unterschied, daß es die Mikro- und Makroelemente nach MURASHIGE und SKOOG (1962) enthielt (s. Tabelle 1). Mit 0,1 n NaOH wurde der pH-Wert der Agarmedien auf 5,8, der der Flüssigmedien auf 5,0 eingestellt. Je 10 ml Agarmedium kamen in Kulturröhrchen ($\varnothing$ 2,2 cm, Länge 15 cm) und je 15 ml Flüssigmedium in Erlenmeyerkolben (100 ml), die anschließend bei 120°C und 1 atm Überdruck 20 Minuten im Autoklaven sterilisiert wurden.

Die Kultivierung der Gewebe erfolgte entweder bei $18^{\circ} \pm 1^{\circ}C$ oder bei $28^{\circ} \pm 1^{\circ}C$ in einem Brutschrank im Dunkeln oder bei 4000 Lux in einer Klimakammer.

Agarkulturen wurden mit einem Übertragungsrhythmus von vier Wochen auf frisches Medium, Suspensionskulturen in ein, zwei oder drei wöchentlichem Turnus überimpft. Die Schüttelgeschwindigkeit bei Flüssigmedien betrug 80 Umdrehungen pro Minute.

Neben lockerem, weichem Kallus bildeten sich auf dem Nährmedium M_s auch Adventivembryonen. Bei Übertragung solcher Embryonen auf M_s ohne 2,4-D, wuchsen sie zu kleinen Karottenpflanzen aus.

Enzyme und Plasmolytika

Zur Zellwandauflösung wurden die Enzympräparate "Cellulase" Onozuka P 1500" aus *Trichoderma viride* und "Macerocym" aus *Rhizopus spec.* der Firma All Japan Biochemicals Co., Ltd. Nishinomiya, Japan verwendet.

Plasmolytikum war hauptsächlich Sorbit, in einigen Fällen noch Mannit, Saccharose und Glucose in p.a. Qualität der Firma Merck.

Isolierungsbedingungen

Da für die Hauptversuche der über sechs Jahre alte Kallusstamm verwendet wurde, werden für diesen die günstigsten Isolierungsbedingungen aufgeführt: Die Zellen kamen zunächst für 30 Minuten in das Medium M_s mit 0,6 M Sorbit, dann wurden 100 - 200 mg Kalluszellen über Nacht (16h) bei $28^{+1}_{-1}^{\circ}\text{C}$ im Dunkeln und ohne Schütteln in 10 ml folgender Lösung inkubiert: 5% Cellulase gelöst im Medium M_s mit 0,6 M Sorbit, pH-Wert 5,0. Die Lösung war zuvor durch ein Bakterienfilter (Schott, Porosität 5) filtriert worden.

Für die Gewinnung von Protoplasten aus anderen Kalluskulturen, Adventivembryonen, Blättern und Wurzeln mußten die Konzentrationen von Cellulase und Sorbit variiert werden. (s. Ergebnisse)

Kulturbedingungen

Die Kultur der Protoplasten erfolgte entweder als Suspension in flüssigem Nährmedium oder in Tropfen über Agar oder direkt in 0,4%igem Agar. Die Nährmedien waren M_w , M_s und Modifizierungen von beiden entsprechendem Sorbitzusatz. Die Plattentechnik nach BERGMANN (1960) wurde in der modifizierten Form von REINERT und von ARDENNE (1964) angewandt.

Lichtmikroskopische Untersuchungen

Für Hell- und Dunkelfelduntersuchungen standen das Laborlux und Orthoplan Mikroskop der Firma Leitz mit Plan-Apochromatischen Objektiven zur Verfügung. Für Direktbeobachtungen von Zellen und Protoplasten in Kultur, insbesondere auf Platten, stand das "Umgekehrte Mikroskop" von LEITZ zur Verfügung.

Spezielle Zell- und Protoplastenuntersuchungen erforderten auch das Phasenkontrastverfahren nach Zernike.

Für fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen wurde sowohl das Auflicht- (Auflichttilluminator nach Pleom) als auch das Durchlichtverfahren angewandt (250 W Hg-Lampe, Filterkombination: Erregerfilter 4 mm BG 38, 3 mm BG 3 mit Sperrfilter K 510).

Für Zellwanduntersuchungen wurde auch die Polarisationsoptik eingesetzt.

Mikrophotographie

Die Mehrzahl der mikrophotographischen Abbildungen wurde mit dem LEITZ-Orthomaten aufgenommen, der sowohl auf dem "Orthoplan" als auch mit Zwischeneinsatz auf dem "Umgekehrten Mikroskop" angebracht werden konnte. Als geeignetes Filmmaterial erwies sich der Agfaortho 25 Professional Film von Agfa-gevaert, für Fluoreszenzpräparate der Ilford Film mit 30 DIN.

Färbungen und Fixierungen

Untersuchungen von lebendem Material

Zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen bzw. Protoplasten wurden Stichproben der jeweiligen Kultur mit 0,01%iger Neutralrotlösung (pH-Wert 7,0 und 5,0) mit entsprechendem Sorbitzusatz vitalgefärbt.

Für Vital-Fluorochromierungen ist eine 0,02%ige Acridinorange-Lösung, für Vital-Diachromierungen eine 0,5%ige Sudan-IV-Lösung verwendet worden.

Die Zellwand wurde nach der Methode von NAGATA et al. (1970) mit 0,1% Calcofluor White St angefärbt.

Untersuchungen von fixiertem Material (Kernfärbungen)

Die Fixierung von Zellen und Protoplasten erfolgte entweder im Gemisch nach CARNOY, Formol oder in gesättigter Pikrinsäure (GERLACH 1969) 20 min bis 1 h oder über Nacht im Kühlschrank. Anschließend wurde das Material mit Isopropanol gewaschen und entweder mit 2% Orcein in 65%iger Essigsäure oder mit Methylgrün-Pyronin gefärbt. Nach Entwässerung in den entsprechenden Alkoholstufen konnten die Präparate in Eukitt oder Glycerin-Gelatine eingebettet werden.

Auszählungen und Abmessungen

Für die Auszählung von Zellen bzw. Protoplasten diente entweder eine Türckkammer 1/400 qmm/0,1 mm oder eine Kammer von 0,75 ml Volumen.

Zellgrößen bzw. Protoplastendurchmesser sind entweder mit einem Meßokular mit 100facher Einteilung oder mit einem Schraubenmikrometerokular von LEITZ bestimmt worden. Pro Probe wurden mindestens 50, meist 100 bis 400 Zellen oder Protoplasten ausgezählt bzw. ausgemessen.

So weit es möglich war, wurden die Ergebnisse statistisch ausgewertet werden. (CAVALLI-SFORZA 1969).

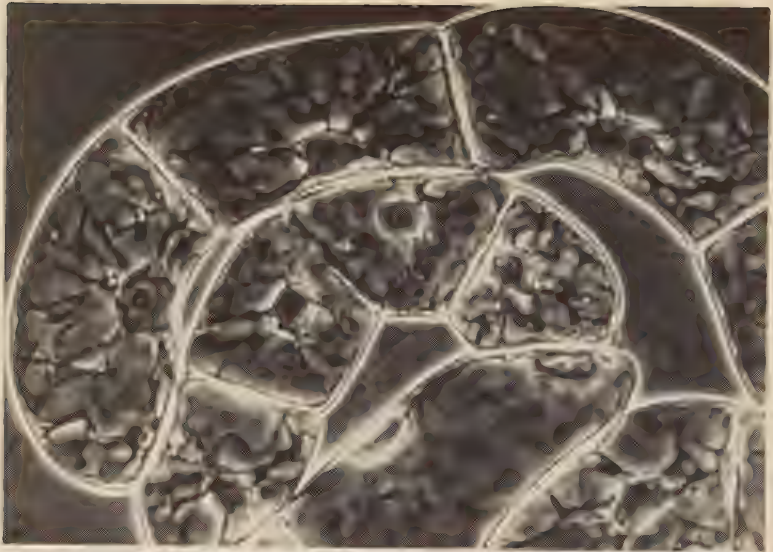


Abb. 1: Typische Fadenzellen des über sechs Jahre alten Kallusstammes von *Daucus carota*. (1 cm $\cong$ 9 μ) (Phasenkontrast)

Abb. 2: Isolierte Protoplasten aus dem alten Kallusstamm
(1 cm $\cong$ 6,6 μ) (Phasenkontrast)

ER G E B N I S S E

=====

A. I s o l i e r u n g v o n P r o t o p l a s t e n

=====

An einer erfolgreichen Isolierung von Protoplasten sind gleichzeitig mehrere Faktoren beteiligt. Es hängt von der Art und dem Zustand der Gewebe ab, welche zellwandabbauenden Enzyme und welche Plasmolytika eingesetzt werden müssen, um möglichst viele intakte Protoplasten zu erhalten. Die Isolierung wird aber auch von dem pH-Wert und der Zusammensetzung des Mediums sowie von der Temperatur beeinflusst. Folgende Faktoren sind daher im einzelnen überprüft worden.

Art, Zustand und "Vorbehandlung" des Gewebes

Protoplasten wurden aus verschiedenem Gewebe von *Daucus carota* isoliert. Art und Zustand der Gewebe sind am besten durch zwei Eigenschaften zu charakterisieren, wodurch auch die entsprechenden Isolierungsbedingungen begründet werden können:

- a - mehr oder minder locker aneinanderhängende, unkorreliert wachsende Kalluszellen
- b - zusammenhängender Gewebeverband unterschiedlich differenzierter Zellen (Embryonen, Wurzeln, Blätter)

Bei der Gewinnung von Protoplasten aus Kalluszellen konnten deutliche Unterschiede zwischen jungem und altem Kallus festgestellt werden, die sich zum Teil aus der Zelltypzusammensetzung erklären lassen.

Der alte Kallusstamm ist seit der Isolierung aus der Rübe über sechs Jahre auf dem Nährmedium M_S kultiviert worden. Er bestand hauptsächlich aus langen, fädigen Zellen und zeigte keinerlei Differenzierungen mehr (Abb. 1). Es gelang, die Zellwände sämtlicher Zellen dieser alten Kalluskulturen aufzulösen, sodaß eine saubere Suspension einzelner Protoplasten von etwa gleicher Größe mit relativ geringer Variationsbreite (10-52 μ) gewonnen wurde (Abb. 2, Fig. 1).

Junge Kalluskulturen, d.h. nach der Isolierung aus der Rübe war maximal ein halbes Jahr vergangen, zeigten mikroskopisch ein völlig anderes Bild. Neben großen Einzelzellen und Fäden, gab

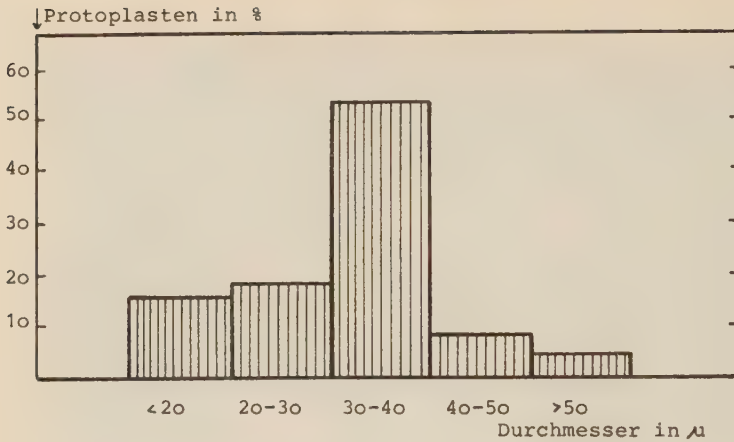


Fig.1: Häufigkeitsverteilung des Durchmessers von frisch isolierten Protoplasten aus alten Kalluszellen. Bei einer Vertrauenswahrscheinlichkeit von 99% beträgt der mittlere Durchmesser $29,4 \mu \pm 3,4 \mu$.

Standardfehler des Mittelwertes multipliziert mit t, Signifikanzschwelle für t nach STUDENT für Irrtumswahrscheinlichkeit $P=1\%$ ist 2,66.

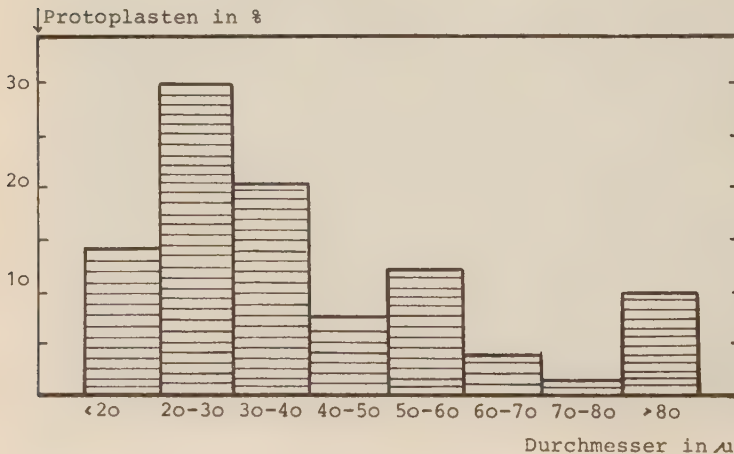


Fig.2: Häufigkeitsverteilung des Durchmessers von isolierten Protoplasten aus jungem Kallusgewebe. Der mittlere Durchmesser ist $38,4 \mu \pm 8,5 \mu$ bei einer Vertrauenswahrscheinlichkeit von 99%.

es vor allem viele Zellaggregate mit kleinen embryonalen Zellen (Abb. 3). Auf dem Medium M_s bildete dieser Kallus Embryonen, auf dem Medium M_w Wurzeln. Nach der Enzymbehandlung blieben oft noch Zellen übrig, deren Zellwände sich nicht vollständig aufgelöst hatten. Der Durchmesser der isolierten Protoplasten betrug im Mittel 38μ mit einer Variationsbreite von $5 - 104 \mu$ (Fig. 2). Außerdem führte die Beseitigung der Zellwände bei den embryonalen Aggregaten dieses jungen Kallusgewebes zu größeren Fusionsprodukten (Abb. 4), sodaß insgesamt eine heterogene Suspension erhalten wurde, die vor weiterer Kultivierung einer entsprechenden Reinigung und Trennung unterzogen werden mußte.

Die Probleme, die sich bereits mit jungem Kallusmaterial zeigten, traten noch stärker bei der Gewinnung von Protoplasten aus Adventivembryonen, Wurzeln und Blättern auf. Der kompakte Zellverband erschwerte eine gleichmäßige Enzymeinwirkung. Da die Wände der Epidermiszellen sehr unvollständig aufgelöst wurden, konnte die Ausbeute an Protoplasten nur gesteigert werden, wenn entweder vor der Enzymbehandlung die Epidermis durch Einritzen und Abschaben beseitigt wurde oder dünne Schnitte des entsprechenden Gewebes angefertigt wurden. In jedem Fall entstand ein Gemisch von Protoplasten aus unterschiedlich differenzierten Zellen. Dementsprechend schwankte die Größe und Art der Protoplasten erheblich. Außerdem waren die Suspensionen mit Zellresten, Xylemteilen und geplatzten Protoplasten verunreinigt.

Protoplasten aus Embryonen wurden hauptsächlich als riesige Massenfusionsprodukte gewonnen (Abb. 4b).

Bei der Isolierung von Protoplasten aus Wurzeln konnten neben stark vakuolisierten auch kleine plasmareiche Protoplasten beobachtet werden (Abb. 5 b).

Protoplasten aus Blättern gaben eine relativ einheitliche Suspension, die aber mit Chloroplasten und anderen Zellbestandteilen verunreinigt war, da viele Zellen während der Isolierung geplatzt waren (Abb. 5 a).

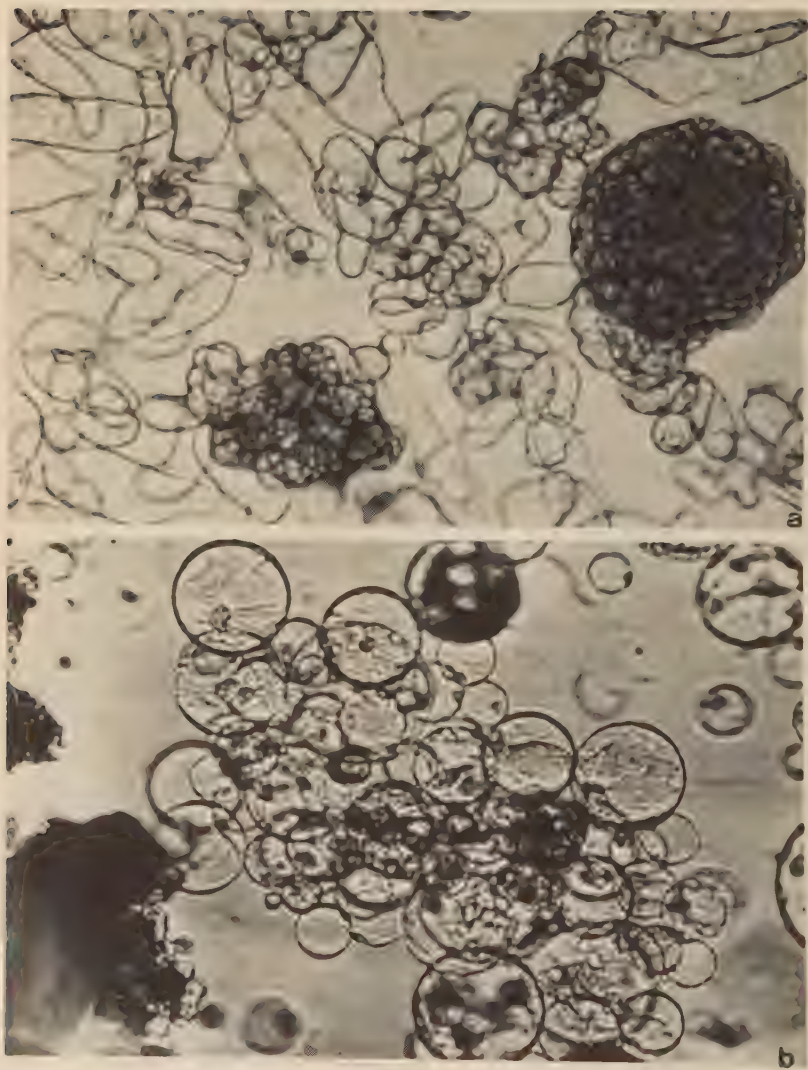


Abb.3: Hellfeldübersichtsaufnahmen von Zellen (a) und von Protoplasten (b) des jungen Kallusgewebes (6 Monate alt) von *Daucus carota*. (a - $1\text{cm} \cong 30\mu$; b- $1\text{cm} \cong 16\mu$)

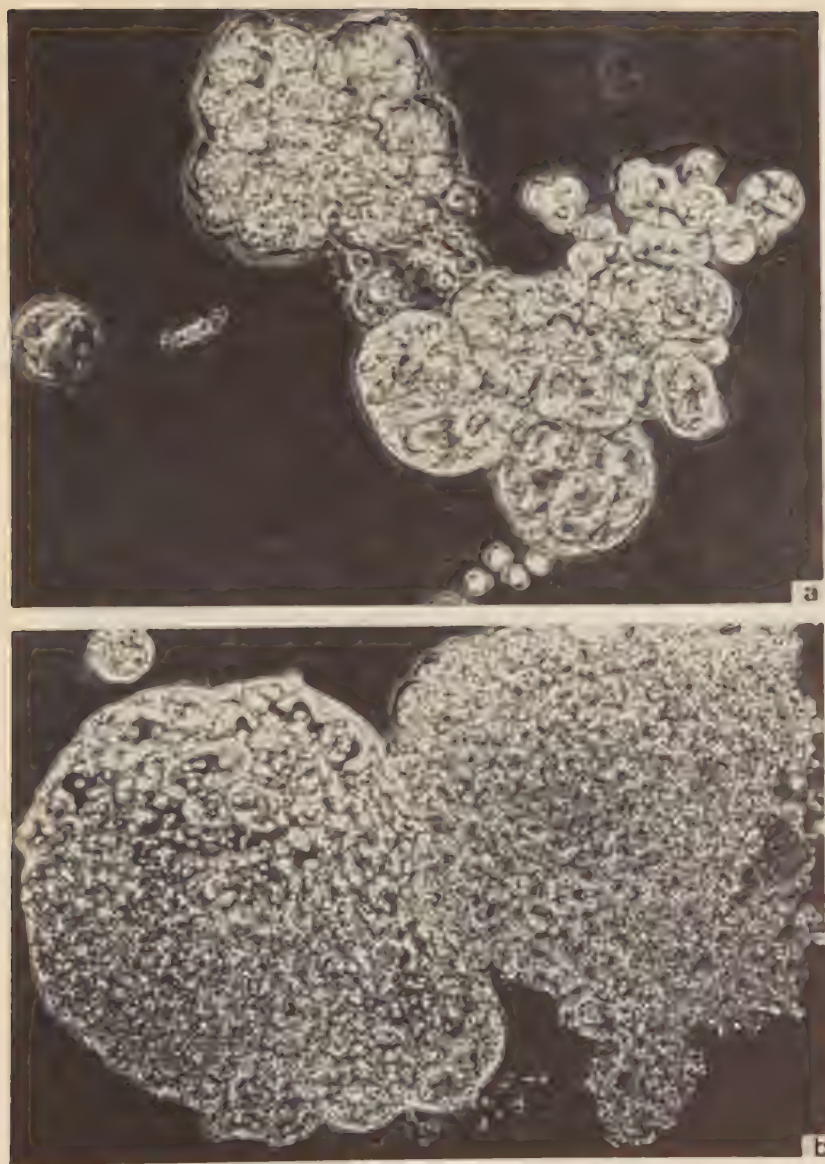


Abb.4: Protoplasten aus embryonalen Zellaggregaten (a) und aus Embryonen (b). Neben wenigen einzelnen Protoplasten entstehen riesige Fusionsprodukte. (Phasenkontrastaufnahmen, 1 cm² 25x4).

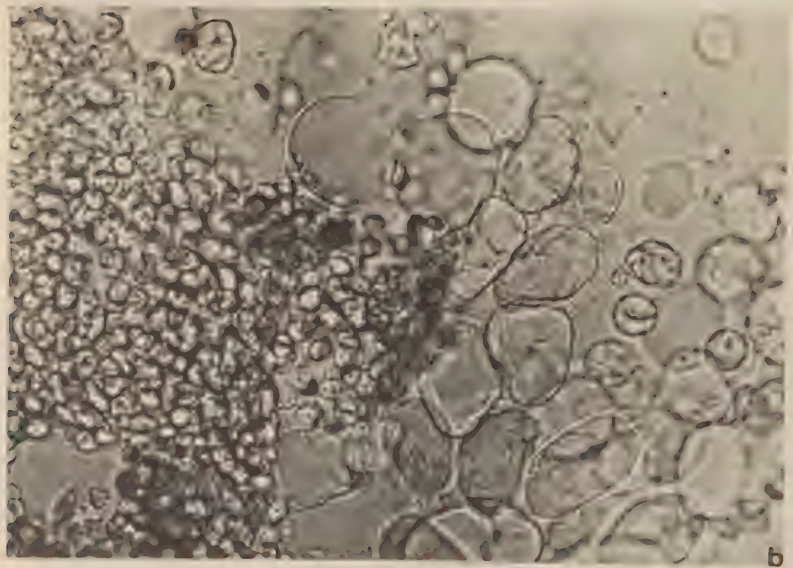
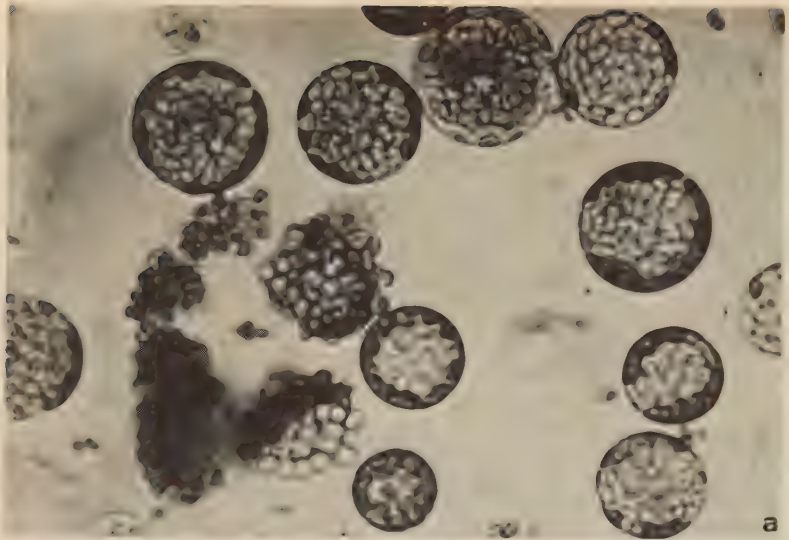


Abb. 5: Protoplasten aus Blättern (a) und aus Wurzeln (b) aus kleinen Karottenpflanzen, die aus Adventivembryonen herangewachsen sind. (a-1cm= 20 μ ; b - 1cm= 25 μ).

"Vorbehandlung" des Zellmaterials

Die Isolierung intakter Protoplasten hängt unter anderem von der Vorbehandlung des Gewebes ab, z.B. von Kulturbedingungen wie Nährmedium, Licht- oder Dunkelanzucht, Agar- oder Flüssigkultur, Übertragungsrhythmus.

So ließen sich aus Kalluskulturen auf dem Medium M_s Zweidrittel mehr Protoplasten gewinnen als aus Zellen desselben Kallusstammes auf dem Medium M'_w .

Kulturen, die im Licht wuchsen, bildeten anscheinend eine wesentlich resistenterere Zellwand, der gleiche Stamm im Dunkeln ergab bis zu 50% mehr Protoplasten.

Für die Reinheit der Protoplasten-"fraktion" waren in jedem Fall Suspensionskulturen geeigneter als Agarkulturen, die größerer Zellaggregate und prozentual einen höheren Anteil toter Zellen hatten.

Einen Einfluß auf die Lebensfähigkeit der Protoplasten hatte auch der Zeitpunkt der letzten Übertragung auf frisches Medium. Am widerstandsfähigsten erwiesen sich Kulturen, die acht Tage nach Überführung in frisches Medium dem Isolierungsprozeß ausgesetzt wurden.

Art, Konzentration der Enzyme und Inkubationszeit

Zur Protoplastisolierung wurden zwei Enzympräparate der japanischen Firma Kiniki Yakult Manuf.Co., Nishinomiya verwendet und zwar die "Cellulase Onozuka P 1500", die aus *Trichoderma viride* gewonnen wird und reich an β -1,3 Glucanase ist, und das "Macerozym", eine Polygalacturonase aus *Rhizopus spec.* Protoplasten aus Kalluskulturen (a) ließen sich im wesentlichen nur mit Cellulase gewinnen. Um Protoplasten aus zusammenhängenden Gewebeverbänden (b) zu isolieren, bedurfte es sowohl einer hohen Cellulase- als auch einer hohen Pectinaseaktivität, die durch die Kombination der Enzympräparate Cellulase Onozuka mit dem Macerocym erreicht wurde.

Es war möglich, eine "Ein-Schritt - Isolierung" oder eine "Zwei-Schritt-Isolation" durchzuführen. Im ersten Fall kam das Gewebe in eine Lösung, die gleichzeitig beide Enzyme enthielt,

im zweiten wurde zunächst der Gewebeverband durch das Macerocym gelockert, wobei auch schon einige Protoplasten freigesetzt wurden und viele Einzelzellen entstanden, die anschließend mit Cellulase behandelt wurden. Die erste Methode wurde der zweiten vorgezogen, da das Gewebe auf diese Weise weniger stark ausgewaschen wurde.

Die günstigsten Konzentrationen waren für Gewebe (a) 5-7% Cellulase, für Gewebe (b) 2,5% Macerocym mit 5% Cellulase.

Niedrigere Konzentrationen erbrachten insgesamt weniger Protoplasten, höhere schädeten den Protoplasten selbst. Bei Versuchen, die Ausbeute an Protoplasten aus jungem Kallus durch Zugabe von Macerocym zu steigern, wurde ein schädigender Effekt des Macerocyms beobachtet.

Um möglichst viele intakte Protoplasten zu isolieren, mußte ein bestimmtes Verhältnis von Gewebemenge zu Enzymlösung eingehalten werden. Zufriedenstellende Ergebnisse ergaben sich bei einer Relation von 100-200 mg Gewebe pro 10 ml Isolierungsmedium. Bei größeren Gewebemengen reichte die Aktivität des Enzyms nicht zur vollständigen Wandauflösung, eine geringere Menge beeinträchtigte die Lebensfähigkeit der Protoplasten (Fig. 3).

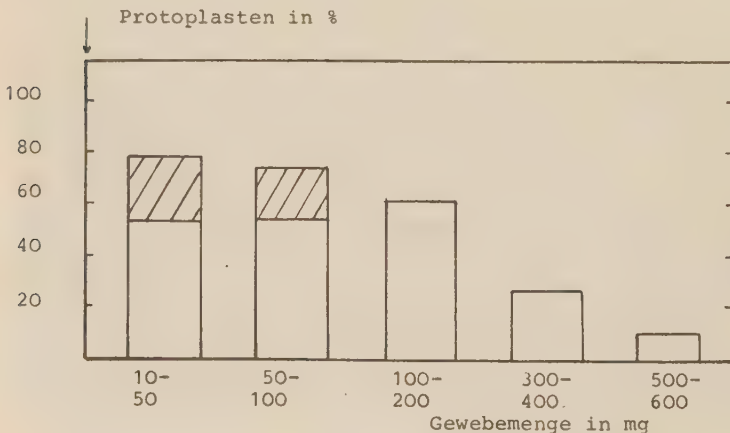


Fig.3: Isolierung von Protoplasten in Abhängigkeit von der Gewebemenge.
Isolierungsmedium: M_s + 5% Cellulase + 0,6 M Sorbit
pH-Wert: 5,0, Inkubationszeit: 7h, Temperatur: 28°C
Gewebe: alter Kallus/10 ml Isolationsmedium
schraffierter Teil: geschädigte Protoplasten

Die Freisetzung der Protoplasten war in Grenzen von der Einwirkungszeit des Enzyms abhängig. Während beim alten Kallus spätestens nach 16 Stunden Behandlung alle Zellen in Protoplasten überführt werden konnten, blieben beim jungen Kallus auch noch nach längerer Inkubationszeit Zellen mit schwach sichtbaren Wänden übrig (Fig.4). Da bis zu zehn Stunden Enzymbehandlung der prozentuale Anteil an bereits isolierten Protoplasten gegenüber noch vorhandenen Zellen erheblich von Versuch zu Versuch schwankte, und zum anderen aber auch aus technischen Gründen, d.h. zur besseren Arbeitseinteilung wurde die Isolierung der Protoplasten meist über Nacht vorgenommen, sodaß am nächsten Tag alle weiteren Schritte wie Reinigen und Plattieren in Ruhe angeschlossen werden konnten.

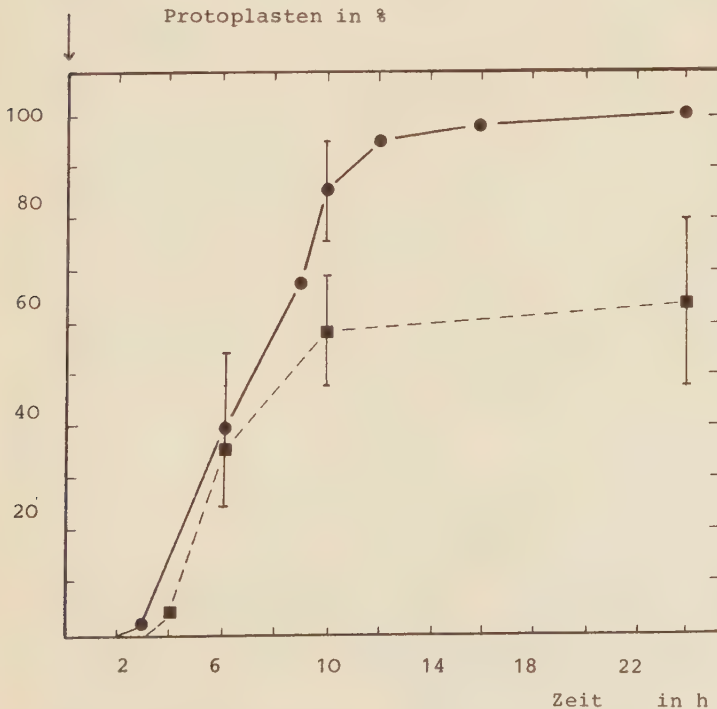


Fig.4: Isolierung von Protoplasten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.
Isolierungsmedium: M_S + 5% Cellulase + 0,6 M Sorbit
pH-Wert: 5,0, Temperatur: 28°C, 200 mg Gewebe/10 ml
Protoplasten aus altem ●—●, jungem ■--■ Kallus.

Art und Konzentration des Plasmolytikums

Die Überführung der Zellen in einen osmotisch stabilen Zustand ist eine Voraussetzung für die erfolgreiche Isolierung von Protoplasten. Der Zusatz eines Plasmolytikums zum Isolierungsmedium verhinderte es, daß die Protoplasten, sobald die Zellwand aufgelöst war, platzen. Um Ioneneinflüsse auszuschalten und möglichst wenig den Stoffwechsel zu beeinflussen, wurde Sorbit als Plasmolytikum gewählt.

Die Bestimmung des osmotischen Wertes des Zellsaftes erfolgte durch Grenzplasmolyse und kryoskopisch durch Messung mit dem Osmometer nach KNAUR. In Lösungen zwischen 0,22 und 0,27 M Sorbit zeigten Zellen des alten Kallusstammes Plasmolyseerscheinungen. Bei Zellen der jungen Kalluskulturen waren größere Schwankungen zu verzeichnen, es wurde zwischen 0,20 und 0,36 M Sorbit benötigt, um in den Bereich der Grenzplasmolyse zu kommen.

Messungen des Zellsaftes ergaben durchschnittlich 250 Milliosmol für alte Zellen und 320 Milliosmol für junge Zellen. Es stellte sich heraus, daß eine ausreichende Festigung der Protoplasten nach der Wandauflösung erst bei wesentlich höheren Konzentrationen an Plasmolytikum erreicht wurde; für Kalluszellen waren 0,4-0,6 M Sorbit, für Gewebe (b) 0,6- 0,8 M Sorbit erforderlich.

Die Zellen wurden im Plasmolytikum 15-30 min vorinkubiert und dann in das Isolierungsmedium M_5 mit Sorbit und Cellulase übertragen.

pH-Wert und Medium

Die Cellulase Onozuka entwickelt nach Angaben des Herstellers ihre optimale Wirkung im Bereich von pH 4 bis 5.

Versuche, Protoplasten in Abhängigkeit vom pH-Wert (4,2-6,7) zu isolieren, ergaben, daß pH 5 der vorteilhafteste Bereich war, da die Cellulase ihre volle Aktivität entfalten konnte, und die Zellen in ihrem gewohnten Pufferungsbereich blieben (Medium der Suspensionskulturen pH 5).

Der Zustand der Protoplasten erwies sich als stabiler, wenn das Medium, in dem die Zellen kultiviert wurden, während des Iso-

lierungsprozesses nicht eliminiert wurde; ein meßbarer fördernder oder hemmender Effekt der Ionen des Nährmediums auf die Enzymaktivität konnte nicht festgestellt werden.

Temperatur

Die optimale Geschwindigkeit der enzymatischen Umsetzung mit Cellulase wurde bei relativ hohen Temperaturen ($40-50^{\circ}\text{C}$) erreicht. Diesen Temperaturbereich überlebten nur wenige Karotenzellen, deren Kultivierungstemperatur bei 18°C oder 28°C lag. Zur Überprüfung möglichst günstiger Bedingungen wurde die Isolierung bei Temperaturen zwischen 10 und 40°C im Brutschrank vorgenommen. Vor der Inkubation wurden die Zellen zunächst eine Stunde an die entsprechende Temperatur gewöhnt. Temperaturen über 30°C beschleunigten den Abbau der Zellwand, doch wurde ein hoher Anteil Protoplasten selbst stark geschädigt, erkennbar am Braunwerden und Verschwinden von Plasmasträngen. Die Isolierung von Protoplasten für alle weiteren Versuche erfolgte daher in dem für die Zellen gewohnten Temperaturbereich.

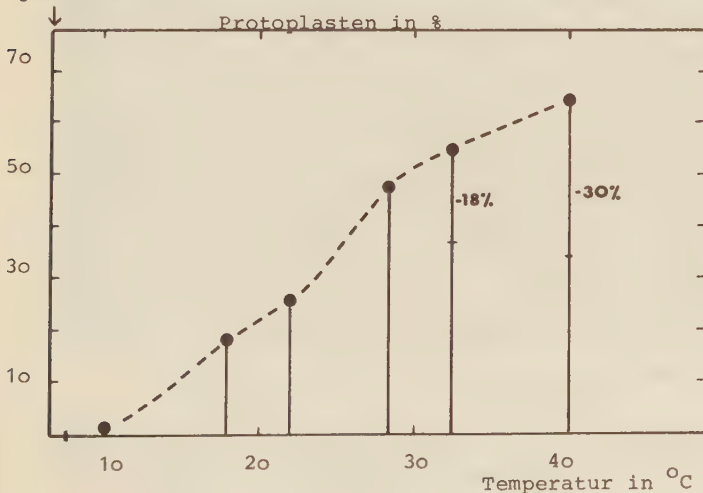


Fig. 5: Isolierung von Protoplasten aus altem Kallusgewebe in Abhängigkeit von der Temperatur.
Isolierungsmedium: M_2 + 5% Cellulase + 0,6 M Sorbit
pH-Wert: 5,0, Inkubationszeit: 6h
(-18% und -30%: Anteil geschädigter Protoplasten)

B. Kultivierung von Protoplasten

1. "Waschen"-(Entfernen des Enzyms, Beseitigen von Zellresten)

Bevor die Protoplasten kultiviert werden konnten, mußten die Enzymlösungen entfernt und die Protoplasten gegebenenfalls von Zellresten und toten Bestandteilen gereinigt werden.

Frisch isolierte Protoplasten sind sowohl mechanischen Reizen als auch vor allem osmotischen Einflüssen gegenüber äußerst empfindlich, sodaß die Entfernung der zellwandabbauenden Enzyme spezielle Probleme stellt. Drei verschiedene Verfahren wurden angewandt: Verdünnen, Zentrifugieren, Filtrieren.

Der alte Kallusstamm, der in einem guten Zustand mit über 90% lebender Zellen von relativ homogener Zusammensetzung war, gab nach der Isolierung eine saubere Protoplastensuspension, sodaß außer der Enzymentfernung keine speziellen Reinigungsschritte erforderlich waren (Abb. 6).

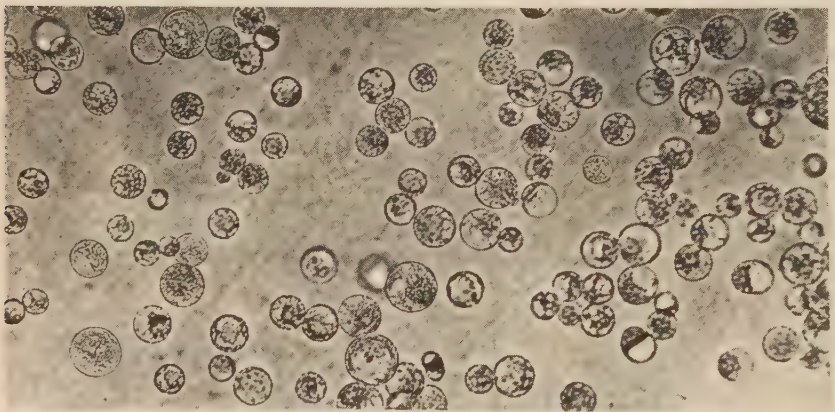


Abb. 6: Protoplastensuspension aus altem Kallusgewebe.
(1 cm $\approx$ 40 μ)

Die schonenste Art, diese Protoplasten vom Enzym freizuwaschen, war das Verdünnen durch langsames Absetzen der Protoplasten am Boden des Gefäßes, Dekantieren und vorsichtiges Überschichten mit enzymfreiem Medium. Dieser Vorgang wurde drei bis fünfmal

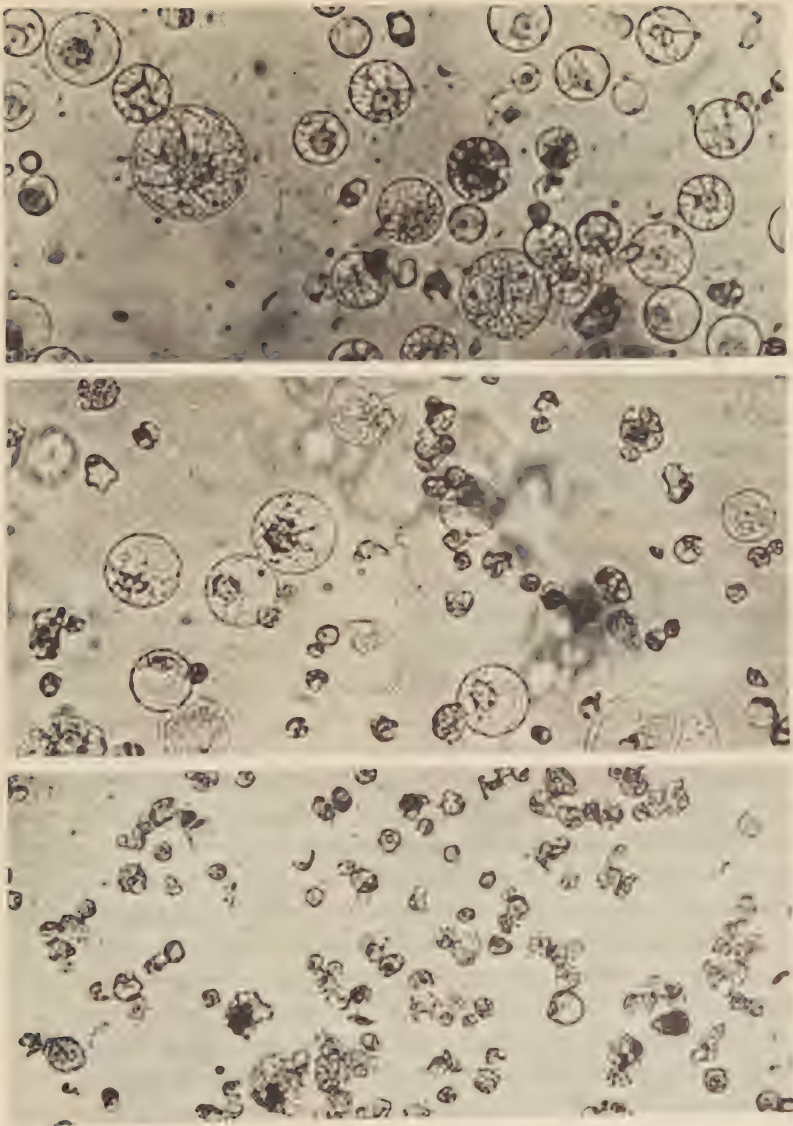


Abb.7: Protoplasten aus altem Kallusgewebe, die 10 Minuten zentrifugiert worden sind bei (a) 100g, (b) 300g, (c) 500g. (1 cm $\cong$ 25 μ).

wiederholt, bevor die Protoplasten ins Kulturmedium überführt wurden.

Bei Versuchen, diese Protoplasten zu zentrifugieren - da das Absetzen längere Zeit in Anspruch nahm - zeigte sich, daß in Abhängigkeit von der Zeit und g-Zahl eine starke Schädigung der Protoplasten eintrat. Die Abb. 7 verdeutlicht diese Schädigung, die vorwiegend durch die starke Vakuolisierung dieser Protoplasten bedingt war.

Protoplasten aus jungem Kallus mußten einem kompliziertem Reinigungsverfahren ausgesetzt werden, da nach der Enzymbehandlung eine Suspension gewonnen wurde, die sich aus Protoplasten, Zellen mit nicht vollständig aufgelösten Zellwänden, Zellresten und teilweise größeren Aggregaten zusammensetzte. Mit einem kombinierten Verfahren von Filtrieren und Zentrifugieren, wurde versucht, eine saubere Protoplasten-"fraktion" zu gewinnen.

Zunächst wurde das Gemisch durch Nylongaze (Porenweite 30 μ , zweimal überkreuz gelegt) filtriert, um auf diese Weise Protoplasten von größeren Zellresten zu trennen, anschließend wurde die Protoplastensuspension auf einen Bakterienfilter ($\emptyset$ 2cm, Porenweite 0,45 μ) gebracht und mit ca. 50 ml enzymfreiem Medium überschichtet und langsam mit der Wasserstrahlpumpe bis auf 1-2 ml abgesaugt. Ein Teil dieser Protoplastensuspension kam sofort ins Kulturmedium, mit dem anderen Teil wurde ein weiterer Reinigungsschritt versucht, indem er in einem diskontinuierlichen Gradienten bei 100 g 5-10 min zentrifugiert wurde. Der Gradient ähnelte dem aus der Arbeit von CHUPEAU und MOREL (1970). Von unten nach oben befanden sich in dem Zentrifugenglas je 5 ml 20% Saccharose, 15% Saccharose, 10% Saccharose und 5% Sorbit. Nach dem Zentrifugieren enthielt die Schicht, die sich zwischen der obersten und mittleren Konzentration angesammelt hatte, weitgehend gereinigte Protoplasten, die mit einer Pasteurpipette ins Kulturmedium überpipetiert wurden. Diese Methode war stets mit einem gewissen Verlust an Protoplasten verbunden. Sie wurde nicht weiter verfeinert, da die Hauptuntersuchungen an Protoplasten aus altem Kallus gemacht wurden.

2. Kulturmedien der Protoplasten

Die Kultivierung der Protoplasten erfolgte hauptsächlich im Nährmedium M_S oder Modifizierungen von diesem. Die Ergebnisse sind im folgenden kurz zusammengefaßt, wobei das Verhalten der Protoplasten im Medium M_S ausführlich erst bei den Hauptversuchen beschrieben wird.

Wurden Protoplasten auf konditioniertem Medium M_S kultiviert, bewirkten noch unbekannte Faktoren, daß vereinzelte Protoplasten stärker aggregierten.

Protoplasten in Gegenwart von Ammenkulturen zu halten, hatte den Effekt einer besonders starken Verformung der Protoplasten zur Folge (Abb. 8 d,e).

Nährmedium M_S ohne 2,4-D führte wahrscheinlich auf Grund von Permeabilitätsänderungen zum schnellen Platzen der Protoplasten.

In zwei Versuchsserien wurden Zellen und Protoplasten des alten Kallusstammes vom Medium M_S auf das TAKEBE Medium (1971) umgesetzt, wobei statt 0,7 M Mannit 0,6 M Sorbit als Plasmolytikum verwendet wurde: Zellen und Protoplasten entwickelten sich wesentlich schlechter als auf dem für sie gewohnten Medium M_S .

3. Kulturbedingungen

Die Protoplasten wurden sowohl im flüssigem Medium als Suspensionskultur als auch auf festem Nährmedium mit Agar kultiviert. Suspensionskulturen wurden vor allem für Versuche mit Stichprobenentnahme angesetzt. Im Gegensatz zu Zellkulturen vertrugen Protoplastensuspensionen kein kontinuierliches Schütteln. Um einen genügenden Gasaustausch zu ermöglichen, wurden die Protoplasten in 100 ml Erlenmeyerkolben mit maximal 10 ml Medium gehalten. Als kritischer Faktor erwies sich die Protoplastendichte. Um Protoplasten längere Zeit am Leben zu erhalten, mußte mit einer Konzentration von 10^3 bis 10^5 Protoplasten pro ml Nährmedium gearbeitet werden.

Zur Beobachtung individueller Protoplasten wurden diese auf Agarplatten kultiviert, wobei verschiedene Techniken angewandt wurden. Entweder wurden die Protoplasten in einem dünnen Flüs-

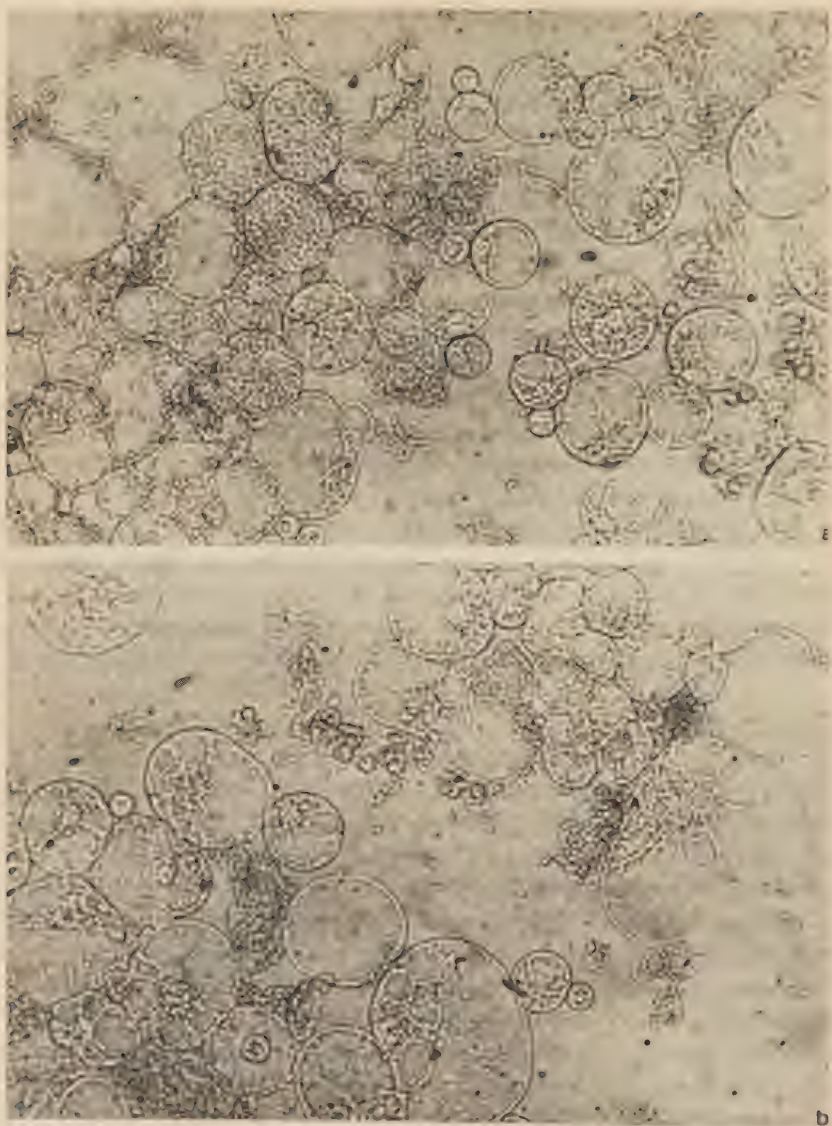


Abb. 8a und 8b: Beginnende Verformung von sieben Tage alten Protoplasten aus über sechsjährigen Kalluskulturen im direkten Kontakt mit dem Agarnährmedium M_s mit 0,4 M Sorbit. (1 cm $\approx$ 20 μ).

sigkeitsfilm über dem Agarmedium, oder in einem Tropfen in einem Glasring ($\varnothing$ 1cm, Höhe 0,5 cm) direkt über dem Agarboden gehalten oder zum Schutz vor Verdunstung in Agar eingebettet. In den meisten Fällen genügten 5 ml Medium mit 0,4 M Sorbit in 0,4%igem Agar, das in kleine Petrischalen ($\varnothing$ 5 cm) gefüllt wurde. Die Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen und in eine größere Petrischale gestellt.

Während Protoplasten aus alten Kalluskulturen in Flüssigkultur ihre kugelige Form beibehielten, verformten sie sich in direktem Kontakt mit dem Agar stark oder bildeten gewebeartige Flächen (Abb. 8a-g).

Die Kultur der Protoplasten erfolgte bis auf wenige Ausnahmen im Dunkeln bei $28^{0\pm} 1^{\circ}\text{C}$.

Versuche, Protoplasten im Licht zu kultivieren, zeigten, daß Zellen und Protoplasten eine unterschiedliche Lichtempfindlichkeit besitzen, denn Protoplasten aus Zellsuspensionskulturen, die im Licht bei 4000 Lux standen, wurden unter diesen Lichtbedingungen braun und die Zahl toter Protoplasten stieg schneller als im Dunkeln an.

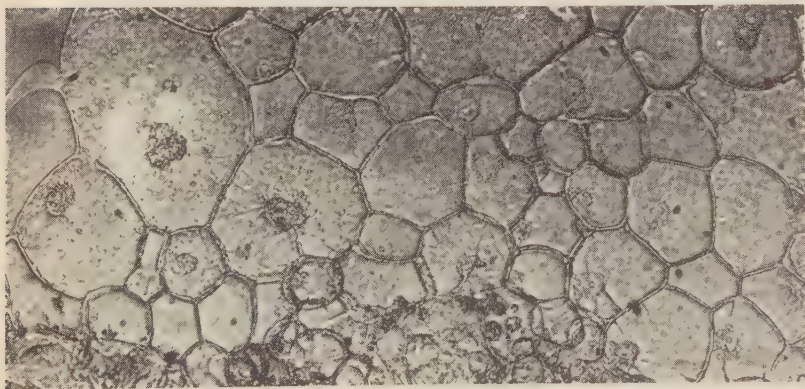


Abb. 8c: Vierzehn Tage alte Protoplasten aus dem alten Kallusstamm, die eine gewebeartige Fläche auf dem 0,4%igem Agarmedium M_5 mit 0,4 M Sorbit gebildet haben (1 cm $\hat{=}$ 30 μ).

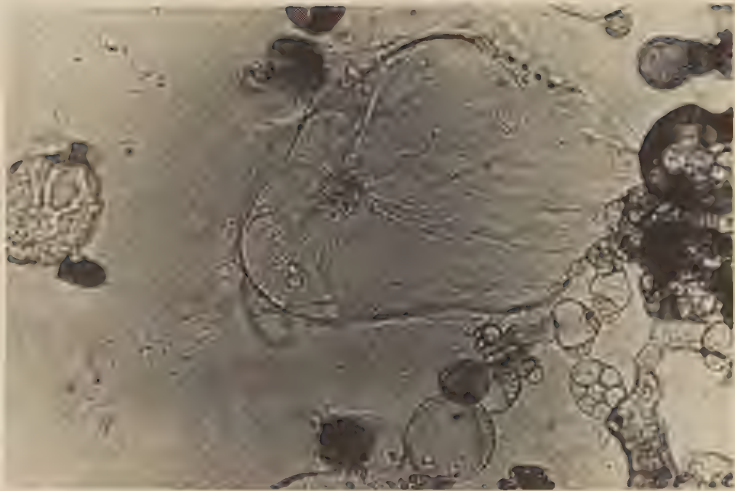


Abb. 8d und 8e: Starke Verformung von Protoplasten aus dem alten Kallusstamm in Gegenwart von Ammenkulturen. (d. 1 cm $\approx$ 29 μ e. 1 cm $\approx$ 15 μ).

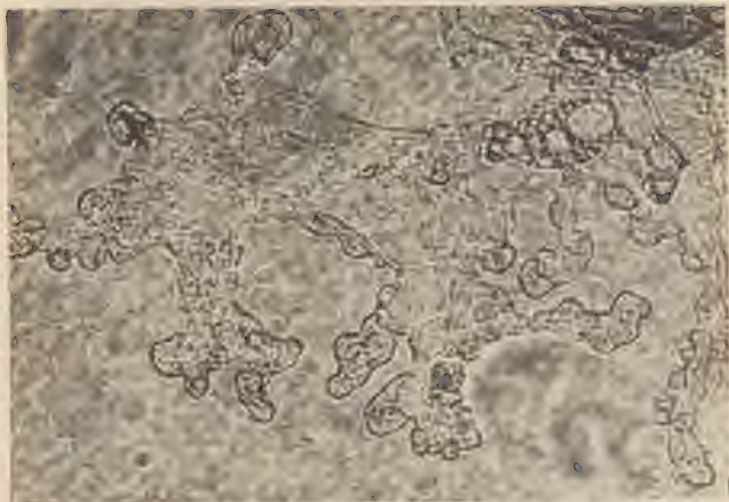
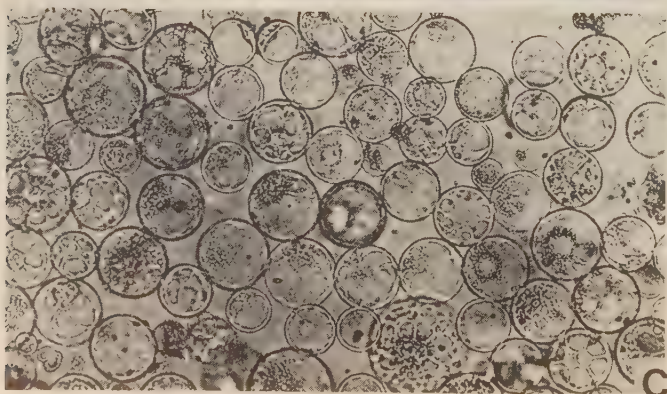
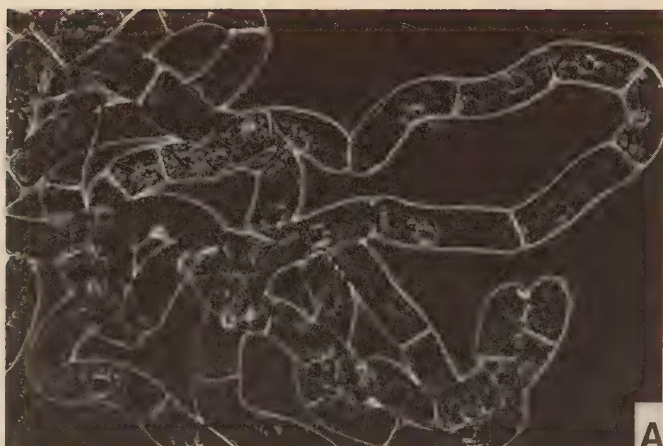


Abb. 8f und 8g: Protoplasten aus altem Kallusgewebe nach einem Monat auf 0,4%igem Agarmedium M₂ mit 0,4 M Sorbit. (1 cm $\approx$ 20 μ). (Vergl. BRIGHT und NORTHROTE 1974)



C. Eigenschaften von Protoplasten

Zur genaueren Beurteilung der Eigenschaften von Protoplasten wurden sie mit denen intakter Zellen verglichen, aus denen sie isoliert worden sind. Der Vergleich wurde auch auf plasmolysierte Zellen der gleichen Zellkultur ausgedehnt, um den Einfluß des Plasmolytikums mit zu berücksichtigen.

Jede Zellsuspension wurde daher in drei Teile geteilt, sodaß nebeneinander unbehandelte Zellen, plasmolysierte Zellen und Protoplasten untersucht werden konnten (Abb. 9).

Die Hauptversuche wurden mit dem über sechs Jahre alten Kallusstamm, in Ergänzung aber auch mit dem jungen Kallusstamm durchgeführt.

Das Medium war M_s , das Plasmolytikum Sorbit in Konzentrationen von 0,2 bis 0,6 M, das zellwandabbauende Enzym die Cellulase Onozuka in 5%iger Konzentration. Die Kultivierung erfolgte bei $28^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ im Dunkeln.

In bestimmten Zeitintervallen wurden jeweils Stichproben von Zellen, plasmolysierten Zellen und Protoplasten entnommen und hinsichtlich folgender Eigenschaften untersucht:

1. Lebensfähigkeit
2. Fusionsfähigkeit
3. Zellwandregenerationsfähigkeit
4. Teilungsfähigkeit

Abb. 9:A. Unbehandelte Zellen des alten Kallusstammes, der als Suspension im Nährmedium M_s kultiviert worden ist. Die Suspension zeichnete sich durch eine hohe Rate lebender Zellen aus, die fast ausschließlich als Ketten langer, fädiger Form auftraten ($1\text{ cm} \hat{=} 37 \mu$).

B. Plasmolysierte Zellen desselben alten Kallusstammes nach Überführung in Medium M_s mit 0,6 M Sorbit ($1\text{ cm} \hat{=} 30 \mu$).

C. Protoplasten aus diesem Kallusstamm, die im Medium M_s mit 0,6 M Sorbit und 5% Cellulase isoliert worden sind. ($1\text{ cm} \hat{=} 25 \mu$)

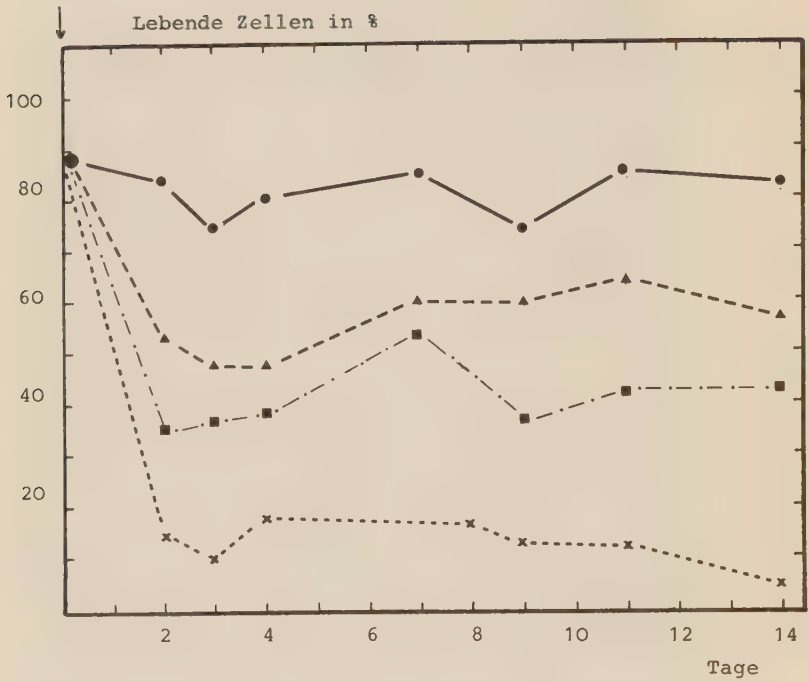


Fig.6: Prozentualer Anteil lebender Zellen des alten Kallusstammes in Flüssigkultur mit unterschiedlichen osmotischen Werten innerhalb einer 14 tägigen Kulturperiode. Medium M ●—●; Medium M mit Sorbit in Konzentrationen von 0,3M ▲---▲; 0,4 M ■-.-■, 0,6 M ×-----×.

Lebensfähigkeit

Unbehandelte Zellen und plasmolysierte Zellen

Als ein Kennzeichen lebender Pflanzenzellen wird die Cytoplasmastromung angesehen. Diese ist aber nicht immer eindeutig an allen Zellen zu erkennen. Daher wurde noch mit Neutralrot und Acridinorange vital gefärbt, um das Verhältnis lebender zu toten Zellen während der Kulturperiode zu bestimmen. In Fig.6 sind die Ergebnisse dargestellt. Es ist deutlich zwischen dem 2. und 4. und zwischen dem 8. und 10. Tag eine Abnahme lebender Zellen zu erkennen, und zwar sowohl auf dem Nährmedium M_s als auch auf Medium M_s mit entsprechenden Konzentrationen des Plasmolytikums.

Nach Übertragung der Zellen in frisches Medium stirbt ein Teil der Zellen ab, doch erhöht sich durch Zellteilungen der Anteil lebender Zellen gegenüber abgestorbenen wieder. Im Laufe einer Woche nehmen die lebenden Zellen wieder geringfügig ab, doch wird diese Abnahme durch erneute Teilungen zwischen dem 8. und 10. Tag ausgeglichen. Untersuchungen zur Teilungsfähigkeit (s.u.) bestätigen eine weitgehende Synchronisation der Zellen.

Dieses "Sich-Einstellen" auf das Nährmedium und der Teilungsrhythmus wird auch im Falle plasmolysierter Zellen deutlich. Gleichzeitig ist aber zu erkennen, daß mit steigendem osmotischen Wert des Nährmediums die Absterberate der Zellen zunimmt. Anscheinend konnten sich nur diejenigen Zellen teilen, die in der Lage waren, sich dem plasmolysierenden Effekt des Mediums anzupassen. Diese Erklärung konnte durch mikroskopische Analyse des Plasmolysezustandes der Zellen erbracht werden (Abb.10c).

In zwei weiteren Versuchsserien wurde die Wirkung des Plasmolytikums auf die Zellen näher untersucht:

a) es wurde der Frischgewichtszuwachs von Zellen auf dem Medium M_s mit verschiedenen Plasmolytika in Konzentrationen von 0,2 bis 0,6 M bestimmt. Um auszuschließen, daß der Effekt auf Sorbit allein beruht, wurden noch Mannit, Glucose und Saccharose als Plasmolytikum gewählt. Dabei ergab sich eine kontinuierliche Hemmung des Wachstums mit zunehmender Konzentration, wobei mit Saccharose die stärkste Hemmung zu verzeichnen war (Fig.7)

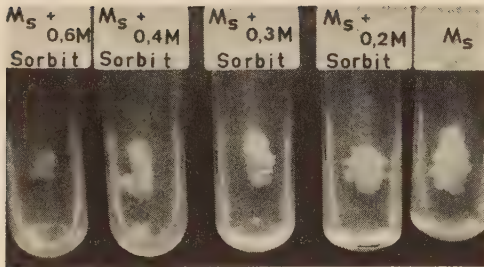


Abb. 10a: Hemmung des Wachstums von Gewebekulturen des alten Kallusstammes auf Medium M_s in Abhängigkeit von der Plasmolytikumkonzentration.

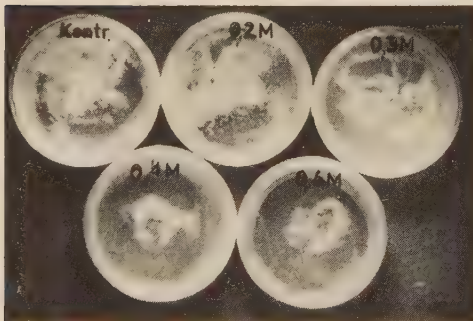


Abb. 10b/ Makroskopischer Überblick über vierzehn Tage alte Kalluszellen auf Agarplatten mit Medium M_s und Sorbit in Konzentrationen von $0,2$ bis $0,6 M$.

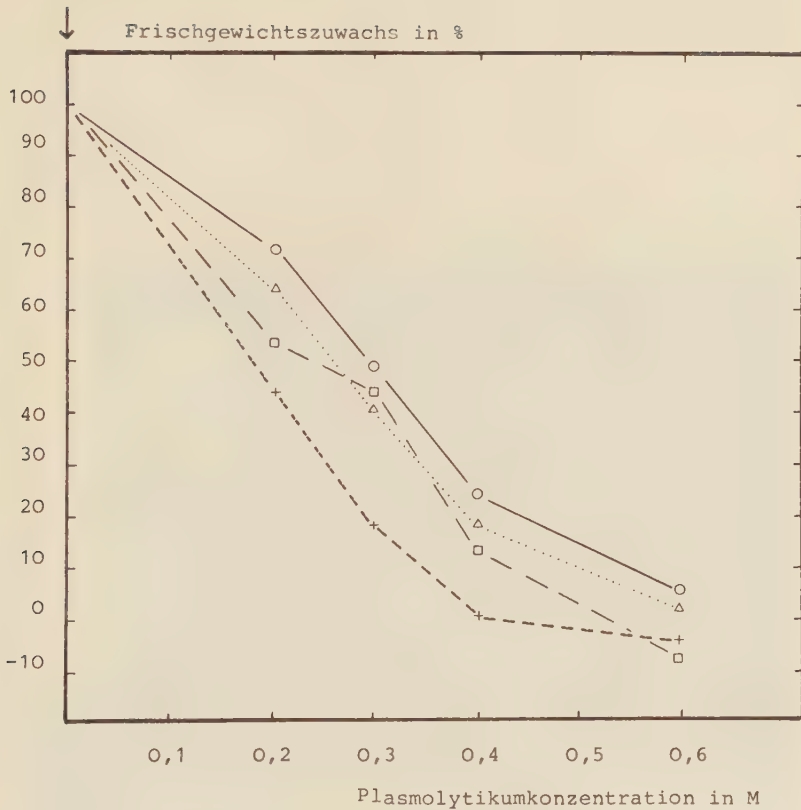


Fig.7: Prozentualler Frischgewichtszuwachs von Gewebekulturen des alten Karottenstammes in Abhängigkeit von verschiedenen Plasmolytikazusätzen in Konzentrationen von 0,2 bis 0,6 M zum Medium M_S , bezogen auf 100 % Zuwachs der Kulturen auf dem Kontrollmedium M_S nach vier Wochen Kulturdauer.

Plasmolytikumszusatz zum Medium M_S in Form von:
 Sorbitol O—O, Mannit Δ.....Δ, Glucose □--□, Saccharose +---+.

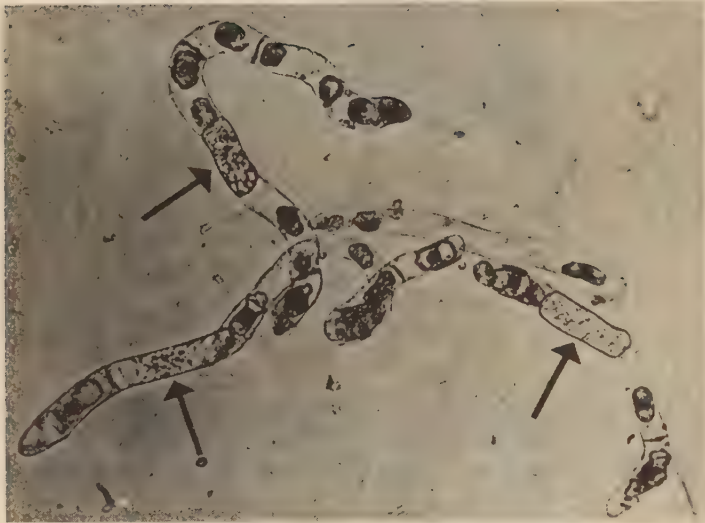


Abb. 10c: Mikroskopischer Ausschnitt von Zellen des alten Kallusgewebes auf dem Agarnährmedium M₂ mit 0,4 M Sorbit, drei Tage alt, bis auf drei durch Pfeile markierte Zellen, die sich deplasmolysiert haben, sind alle anderen Zellen abgestorben. (1cm $\hat{=}$ 17 μ)

b) Beobachtung einzelner Zellen auf Agarplatten mit Medium M_s , dem Sorbit zwischen 0,2 und 0,6 M zugesetzt worden war.

Die Zahl lebender Zellen nahm mit steigender Plasmolytikumkonzentration ab. Abb.10 zeigt, daß nur Zellen, die zur Deplasmolyse fähig sind, überleben.

Tabelle 2 gibt die Zahl deplasmolysierter Zellen in den entsprechenden Sorbitkonzentrationen nach drei Tagen Kultur wieder.

Medium M_s mit Sorbit in M	deplasmolysierte Zellen in % nach drei Tagen Kultur
0,2	100
0,3	65
0,4	30
0,6	5

Neben diesen Beobachtungen wurde noch folgende morphologische Veränderung der plasmolysierten Zellen gegenüber den Kontrollzellen, die auf dem Medium M_s ohne Sorbit kultiert worden sind, festgestellt : während Zellen ursprünglich eine große Vakuole enthielten, bildeten sie unter dem Einfluß des Plasmolytikums viele kleine Vakuolen aus (Abb.10d) .

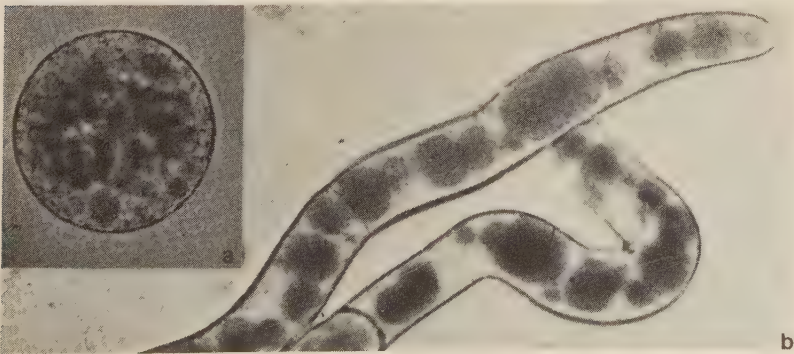


Abb.10d: Protoplast (a) und Zellen(b) der alten Kalluskulturen mit vielen, kleinen durch Neutralrot vitalgefärbten Vakuolen. (a- $1\text{ cm} \approx 40\text{ }\mu$) (b - $1\text{ cm} \approx 27\text{ }\mu$) .

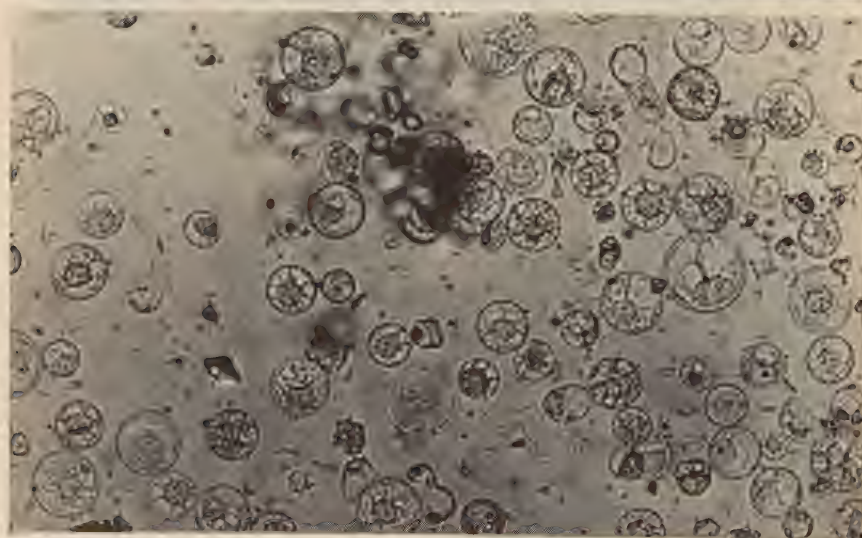


Abb. 11: Überlichtsaufnahmen von Protoplasten aus über sechs Jahren alten Kalluskulturen im Nährmedium M_2 mit 0,6 M Sorbit

a: eine Woche alt, $1\text{ cm} \cong 47\text{ }\mu$, b: zwei Wochen alt, $1\text{ cm} \cong 6,1\text{ }\mu$

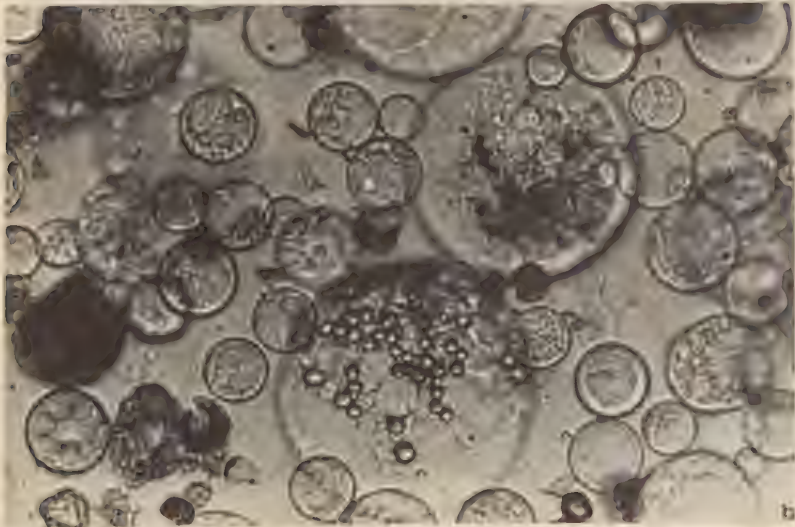
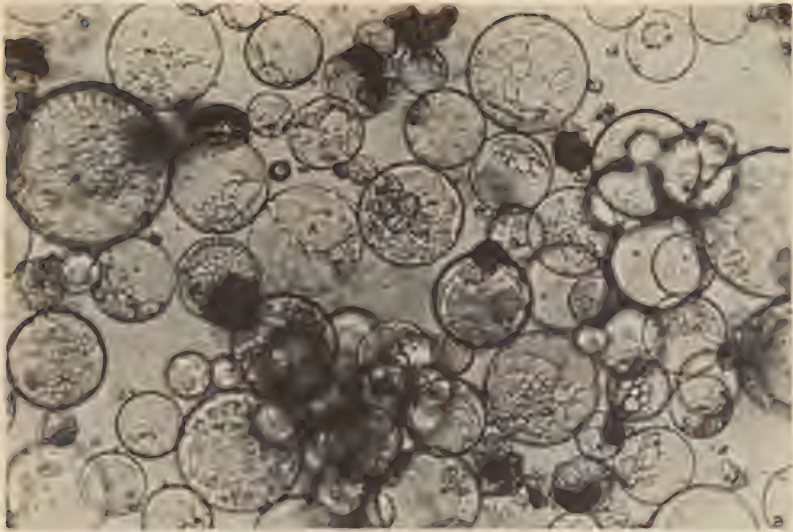


Abb. 12: Protoplastensuspensionen aus dem alten Kallusstamm von *Daucus carota* im Nährmedium M_s mit 0,6 M Sorbit.
a: ein Monat alt, $1\text{ cm} \approx 52\ \mu$, M_s b: drei Monate alt, $1\text{ cm} \approx 64\ \mu$).

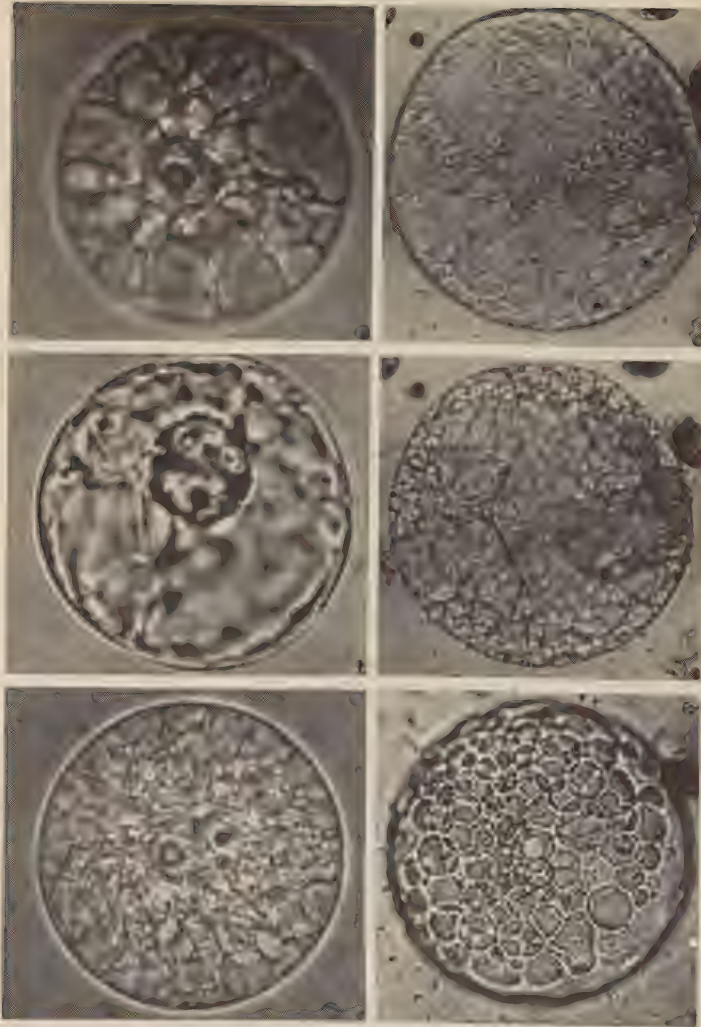


Abb. 13a: Verschiedene Protoplastentypen aus alten Kalluskulturen von *Daucus carota*.

- | | |
|---|--|
| (a) 2 Tage alt, $\varnothing$ 30 μ , | (d) 5 Wochen alt, $\varnothing$ 115 μ |
| (b) 6 Tage alt, $\varnothing$ 51 μ , | (e) 6 Wochen alt, $\varnothing$ 109 μ |
| (c) 28 Tage alt, $\varnothing$ 93 μ , | (f) 16 Wochen alt, $\varnothing$ 234 μ |

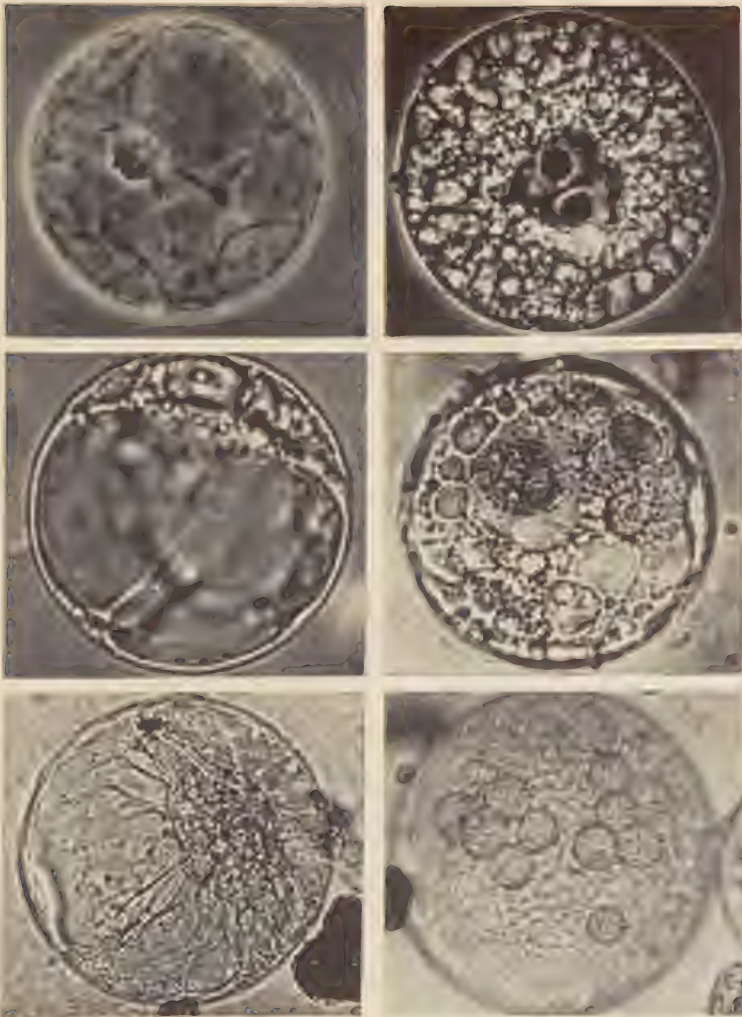
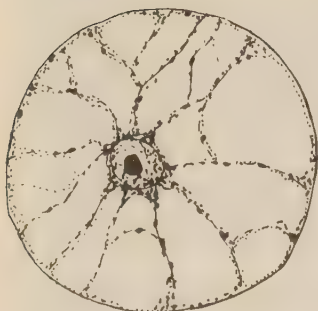


Abb. 13b: Verschiedene Protoplastentypen aus alten Kalluskulturen von *Daucus carota*.

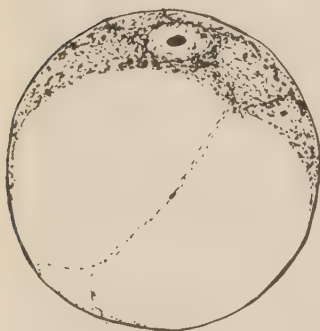
- (a) 1 Tag alt, $\varnothing$ 33 μ , (d) 3 Wochen alt, $\varnothing$ 62 μ
(b) 7 Tage alt, $\varnothing$ 50 μ , (e) 5 Wochen alt, $\varnothing$ 90 μ
(c) 150 Tage alt, $\varnothing$ 405 μ , (f) 12 Wochen alt, $\varnothing$ 560 μ .

Drei charakteristische Protoplastenformen



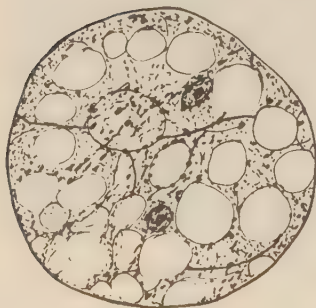
"Plasmafädentyp"

Sternförmig vom Kern aus umspannen viele Plasmafäden eine zentrale große Vakuole; entsteht aus plasmareichen nicht zu stark vakuolisierten Zellen. Gut sichtbare Plasmaströmung.



"Sichelmondtyp"

Cytoplasma und Kern liegen auf einer Seite des Protoplasten, der eine große Vakuole hat, die von einem sehr dünnen Plasmabelag umgeben ist; entsteht aus stärker vakuolisierten Zellen.



"Vakuolentyp"

Tritt besonders häufig in älteren Protoplastenkulturen auf, hat unterschiedlich viele und verschieden große Vakuolen.

Lebensfähigkeit der Protoplasten

Während nur wenige Zellen unter so hohen osmotischen Außenbedingungen überleben konnten, benötigten Protoplasten dieser alten Kalluszellen ein hypertonisches Medium zur Stabilisierung ihres Zustandes. Ihre Überlebenschance war sogar in höheren Konzentrationen des Plasmolytikums größer; eine Woche nach der Isolierung wurden in Medium M_s mit 0,6 M Sorbit durchschnittlich 90%, mit 0,3 M Sorbit nur 75% lebender Protoplasten gezählt.

Die Lebensfähigkeit der Protoplasten wurde über längere Kulturperioden verfolgt. Die Zahl lebender Protoplasten nahm ganz allmählich ab, wobei nach fünf Monaten Kultur immer noch der Anteil lebender Protoplasten 25% betrug. Vereinzelt konnten Protoplasten sogar über ein Jahr, in einem Versuch über 22 Monate in Kultur gehalten werden. Fig. 8 gibt den Anteil lebender Protoplasten während einer 20 wöchigen Kultur wieder.

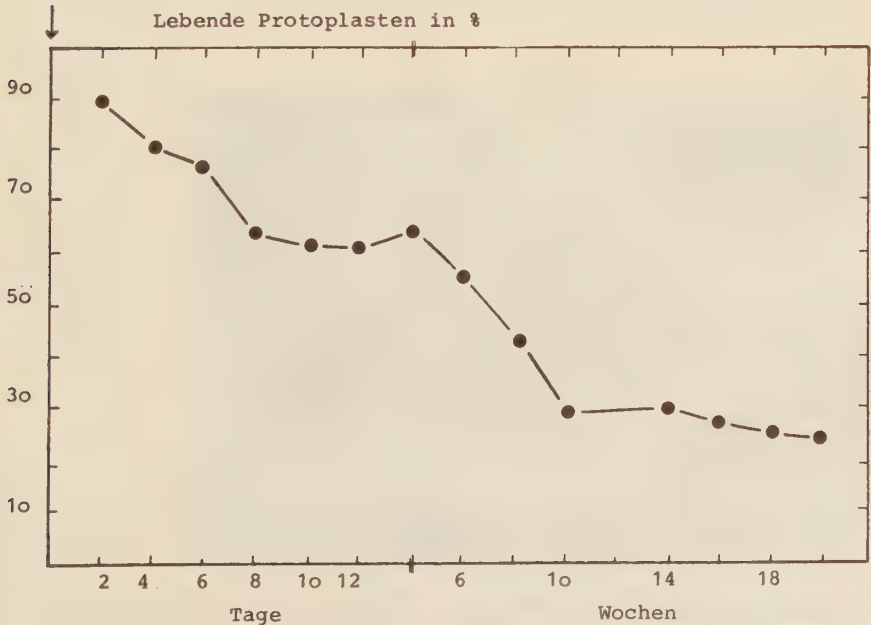


Fig. 8: Prozentualler Anteil lebender Protoplasten aus alten Kalluskulturen im Nährmedium M_s mit 0,6 M Sorbit in Abhängigkeit von einer längeren Kulturdauer.

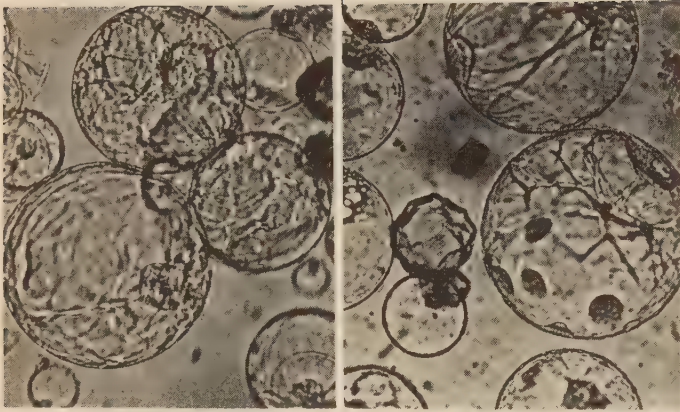


Abb. 14: Protoplasten aus dem alten Kallusstamm von *Daucus carota* nach 20 wöchiger Kultur im Flüssigmedium M_s mit 0,6 M Sorbit ($1\text{ cm} \approx 73\text{ }\mu$).

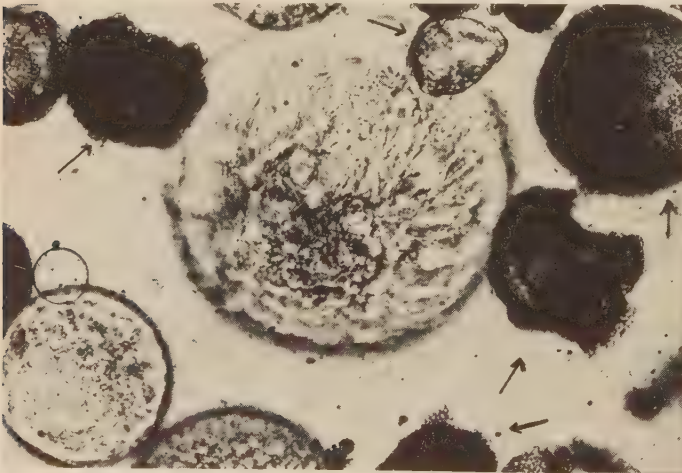


Abb. 15: Ein Jahr alter Riesenprotoplast mit noch gut sichtbarer Plasmaströmung. Volumen: $17 \times 10^6\text{ }\mu^3$. (Pfeile: tote, schalenförmige Protoplastenhüllen) ($1\text{ cm} \approx 71\text{ }\mu$).

Die Abb. 11 bis 14 zeigen einige besonders typische Protoplasten von unterschiedlicher Größe und Gestalt, wie sie regelmäßig in den Kulturen gefunden werden konnten. Auffallenderweise waren in älteren Protoplastensuspensionen neben vielen toten meist "schalenförmigen" Protoplasten, Riesenprotoplasten mit einem Durchmesser von 200-300 μ , in einigen Fällen sogar über 500 μ (Abb. 15).

Bis auf wenige Ausnahmen behielten Protoplasten aus alten Kalluszellen im Flüssigmedium während der gesamten Kulturzeit ihre ursprüngliche Kugelform bei. Als sichtbares und gut meßbares Kriterium einer Veränderung der Protoplasten insbesondere unter dem Einfluß von Plasmolytikum konnte daher der Durchmesser über eine drei bis vierwöchige Kulturperiode bestimmt werden (Fig. 9, Tabelle 3).

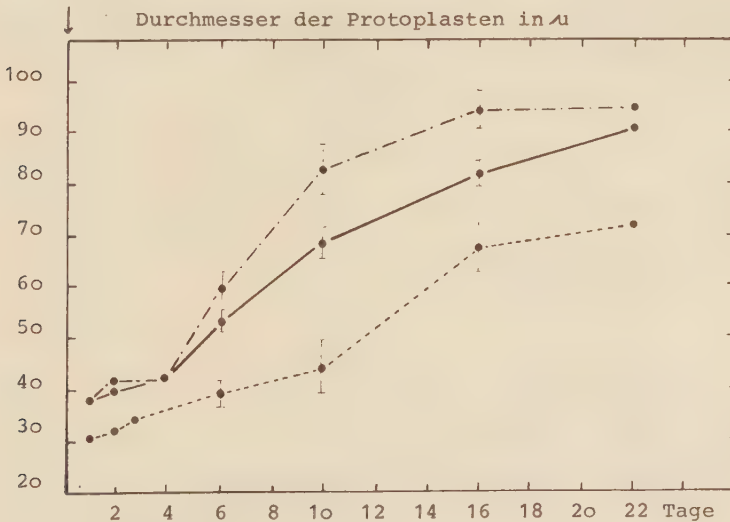


Fig. 9: Durchmesser von Protoplasten aus alten Kalluskulturen während einer Kulturperiode von 22 Tagen im Medium M_8 mit 0,3 M ---, 0,4 M — und 0,6 M ---- Sorbit. Für den 6., 10. und 16. Tag ist die Standardabweichung der Mittelwerte ($n=50$) mit 99%igem Vertrauensbereich eingezeichnet.

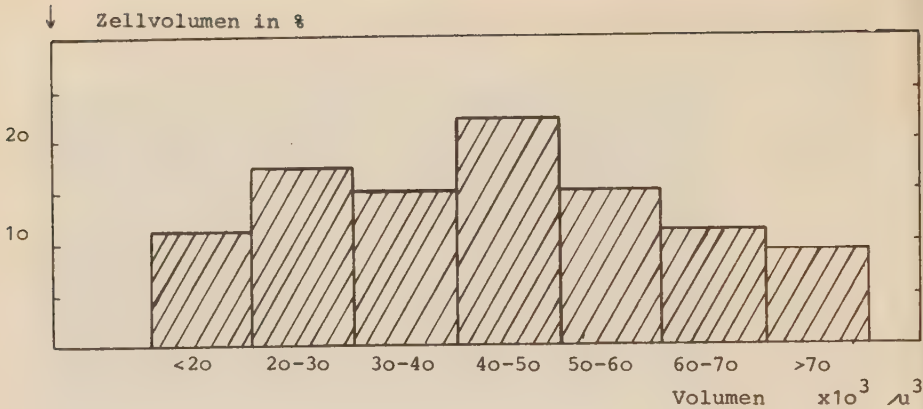


Fig. 10: Häufigkeitsverteilung des Zellvolumens ($V = \pi r^2 h$) von Suspensionszellen des alten Kallusstammes im Nährmedium M_s .

Das mittlere Volumen ist $43 \cdot 10^3 \mu^3 \pm 5 \cdot 10^3 \mu^3$ bei einer Vertrauenswahrscheinlichkeit von 99%.

(Der Standardfehler des Mittelwertes wurde mit t multipliziert, Signifikanzschwelle für t nach STUDENT für Irrtumswahrscheinlichkeit $p = 1\%$ ist 2,66,

$$s_m = \frac{s}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{13583}{50}} = 1921, \quad s_m \cdot t = 1921 \cdot 2,66 = 5$$

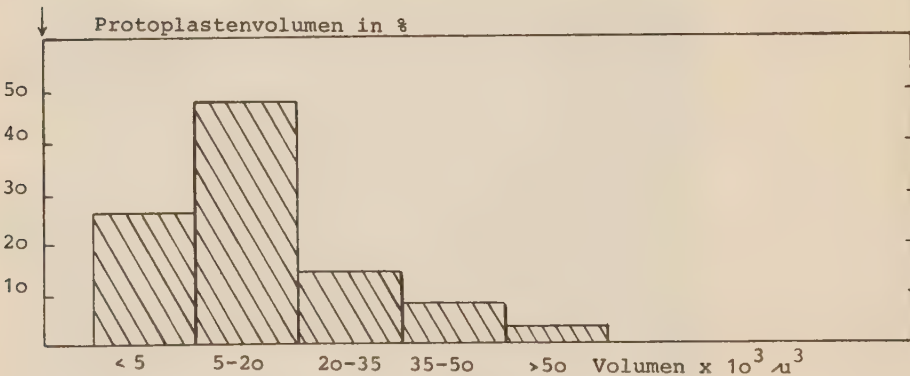


Fig. 11: Häufigkeitsverteilung des Volumens ($V = 1/6 \pi d^3$) frisch isolierter Protoplasten aus dem alten Kallusstamm.

Das mittlere Volumen wurde zu $13 \cdot 10^3 \mu^3 \pm 5 \cdot 10^3 \mu^3$ bei einer Vertrauenswahrscheinlichkeit von 99% errechnet.

Neben den Angaben der Durchmesser gibt Tabelle 3 auch die entsprechenden Oberflächen und Volumina der Protoplasten aus altem Kallusgewebe in drei verschiedenen Medien wieder. Die Standardabweichung der Mittelwerte (Vertrauenswahrscheinlichkeit 99%) zeigt, daß die Unterschiede der Durchmesser, Oberflächen und Volumina während der Kulturperiode als statistisch gesichert gelten können.

Nach der Isolierung im Medium M_s mit 0,6 M Sorbit und 5% Gelulase hatten die Protoplasten einen durchschnittlichen Durchmesser von 29,4 μ , das entsprechende mittlere Volumen ergab aufgerundet $13 \times 10^3 \mu^3$; die prozentuale Verteilung ist in dem Histogramm (Fig. 11) dargestellt.

Zum Vergleich wurde das ursprüngliche Zellvolumen berechnet. Die langgestreckten Fadenzellen der alten Kallussuspensionen wurden bei der Volumenberechnung vereinfachend als Zylinder betrachtet. Das durchschnittliche Volumen konnte so zu $43 \times 10^3 \mu^3$ berechnet werden. Das Histogramm (Fig. 10) verdeutlicht auch hier die prozentuale Verteilung des Zellvolumens. Der Vergleich der beiden Volumina ergibt nun, daß Protoplasten ein um $30 \times 10^3 \mu^3$ kleineres Volumen haben als Zellen, d.h. während der Isolierung ist durch die Plasmolyse ein Zellsaftverlust von 70% eingetreten.

Das ursprüngliche Volumen erreichten Protoplasten bei sofortiger Überführung in Medium M_s mit 0,3 M Sorbit spätestens nach 2,5 Tagen, mit 0,4 M Sorbit nach 3,5 Tagen und in Medium M_s mit 0,6 M Sorbit nach 5,5 Tagen.

Im Verlauf der Kultur nehmen die Protoplasten aber weiter an Größe zu, sodaß bezogen auf das Zellvolumen nach einer 28-tägigen Kultivierungszeit in Medium M_s mit 0,3 M Sorbit eine 17-fache, mit 0,4 M Sorbit eine 11-fache und mit 0,6 M Sorbit eine 6-fache Volumenvermehrung der Protoplasten eingetreten ist. Bei Bezug auf das Volumen frisch isolierter Protoplasten entspricht das einer 56-fachen Vergrößerung der Protoplasten in 0,3 M, einer 39-fachen in 0,4 M und einer 21-fachen in 0,6 M Sorbit. Fig. 12 gibt die prozentuale Zunahme der Durchmesser, Oberflächen und Volumina in den drei Medien wieder.

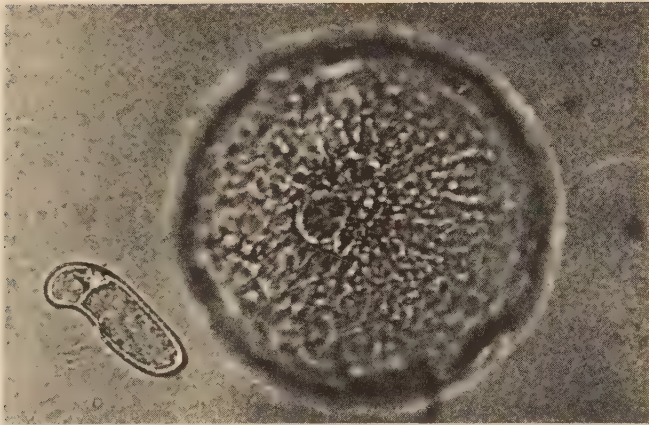


Abb. 16: Zwei Monate alter Protoplast neben einer Zelle des alten Kallusstammes (1cm = 50 μ). Das Volumen des Protoplasten ist ca. 130 mal größer als das der Zelle.

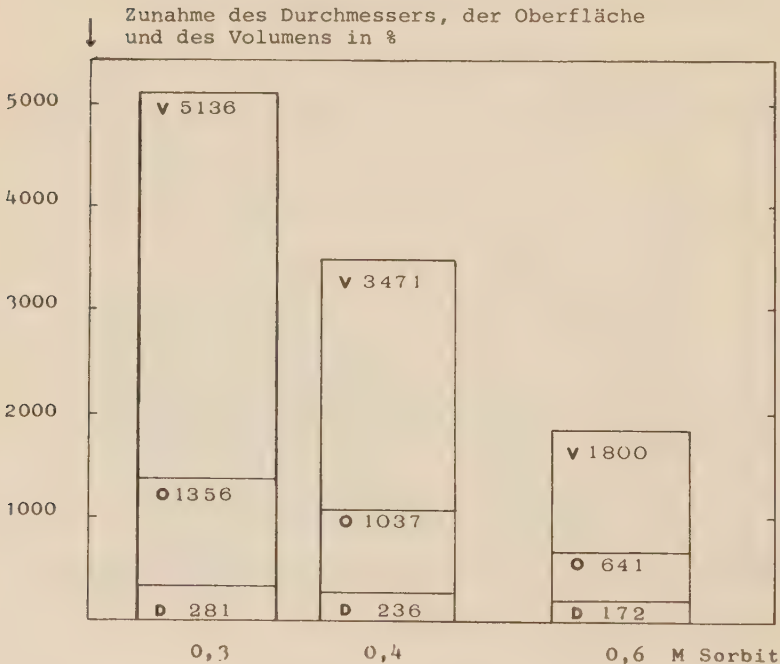


Fig. 12: Prozentuale Durchmesser - (D), Oberflächen- (O) und Volumenzunahme (V) der Protoplasten aus altem Kallus in Abhängigkeit von der Plasmolytikumkonzentration nach 28 Tagen Kultur.

Tab. 3: Mittelwerte von Durchmesser, Oberfläche und Volumen kugelförmiger Protoplasten aus alten Kalluskulturen im Nährmedium M_s mit verschieden hoher Sorbitkonzentration.

Angabe des Vertrauensbereiches für eine statistische Sicherheit von 99% , $n = 50$, $t = 2,66$; $\bar{x} \pm \frac{s}{\sqrt{n}} t$

Zeit in Tagen	Durchmesser d in μ	Oberfläche πd^2 $\times 10^3 \mu^2$	Volumen $\frac{1}{6} \pi d^3$ $\times 10^4 \mu^3$
0	29,4 $\pm$ 3,4	2,7 $\pm$ 0,6	1,3 $\pm$ 0,5
Medium M_s +0,3 M Sorbit			
2	38,0 $\pm$ 4,0	4,5 $\pm$ 1,0	2,9 $\pm$ 1,0
4	48,7 $\pm$ 6,0	7,5 $\pm$ 1,8	6,1 $\pm$ 2,5
7	57,7 $\pm$ 4,1	10,5 $\pm$ 1,5	10,1 $\pm$ 2,3
10	84,6 $\pm$ 7,5	22,5 $\pm$ 4,0	31,7 $\pm$ 9,2
16	93,6 $\pm$ 6,2	27,5 $\pm$ 3,6	42,9 $\pm$ 9,1
28	111,9 $\pm$ 5,9	39,3 $\pm$ 4,1	73,3 $\pm$ 12,2
Medium M_s +0,4 M Sorbit			
2	32,8 $\pm$ 3,6	3,3 $\pm$ 0,7	1,9 $\pm$ 0,6
4	43,0 $\pm$ 4,1	5,8 $\pm$ 1,1	4,2 $\pm$ 1,3
7	50,8 $\pm$ 3,9	8,1 $\pm$ 1,2	6,9 $\pm$ 1,7
10	72,0 $\pm$ 4,4	16,3 $\pm$ 2,0	19,6 $\pm$ 3,8
16	79,2 $\pm$ 5,6	19,7 $\pm$ 2,8	26,0 $\pm$ 6,9
28	98,8 $\pm$ 5,8	30,7 $\pm$ 3,6	50,0 $\pm$ 9,4
Medium M_s +0,6 M Sorbit			
2	30,3 $\pm$ 3,8	2,8 $\pm$ 0,7	1,5 $\pm$ 0,6
4	34,7 $\pm$ 3,9	3,8 $\pm$ 0,9	2,2 $\pm$ 0,8
7	41,9 $\pm$ 4,2	5,5 $\pm$ 1,1	3,8 $\pm$ 1,3
10	53,9 $\pm$ 4,5	9,1 $\pm$ 1,5	8,2 $\pm$ 2,2
16	63,2 $\pm$ 9,0	12,5 $\pm$ 3,6	13,2 $\pm$ 6,4
28	79,9 $\pm$ 7,0	20,0 $\pm$ 3,5	26,6 $\pm$ 7,6

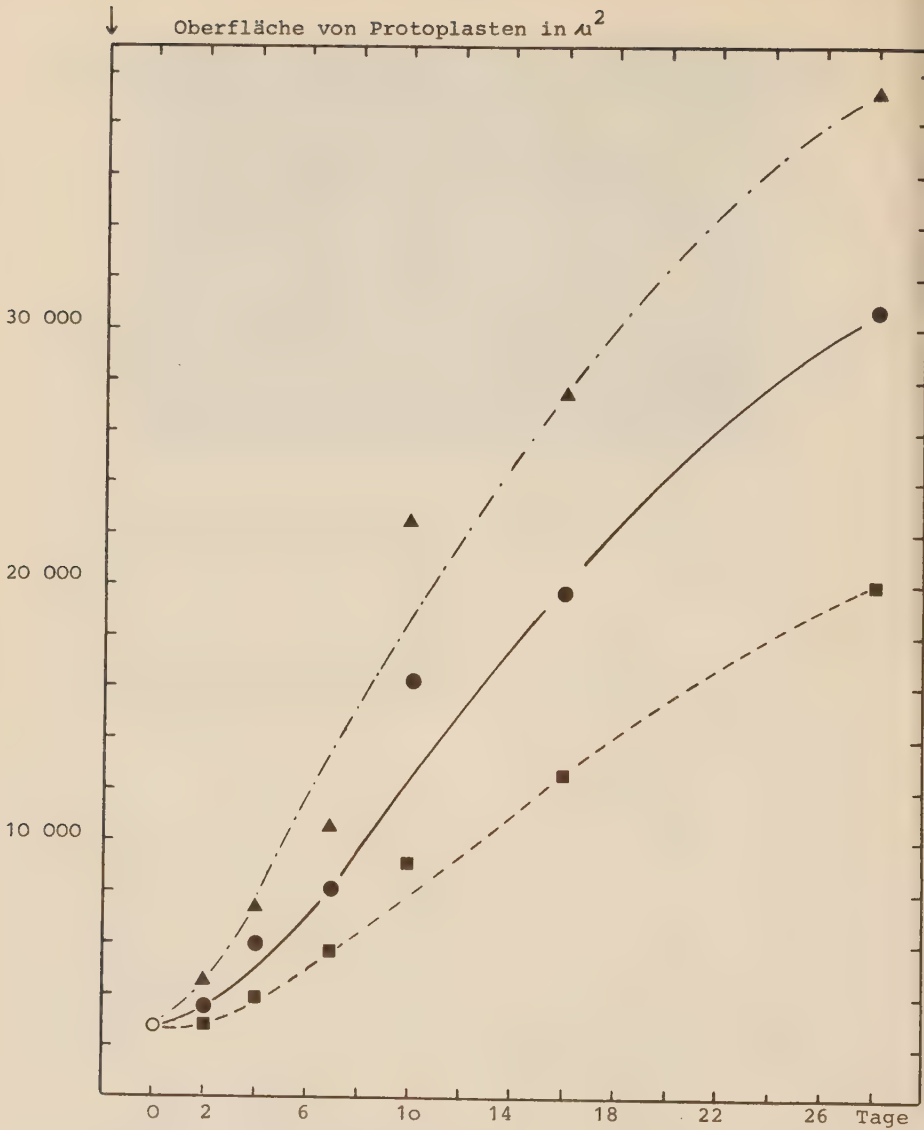


Fig. 13: Oberflächenzunahme der Protoplasten aus alten Kalluskulturen von *Daucus carota* innerhalb 28 Tagen im Medium M_s mit 0,3 M ---, 0,4 M — und 0,6 M ---- Sorbit.

Mikroskopische Untersuchungen der Protoplasten zeigten, daß dieser Größenzuwachs nicht nur auf einer Wasseraufnahme beruhen konnte, sondern daß es sich um echte Syntheseleistungen handeln mußte, da die Vakuolen der Protoplasten von einem dichten Plasmabelag umgeben waren (Abb.14-16).

Unterstützt werden diese Befunde auch durch die Betrachtung der Oberflächenvergrößerung (Fig. 13), die in diesem Fall einer lebenden Membran, dem Plasmalemma gleichgesetzt werden darf. So läßt sich innerhalb von 28 Tagen eine 14-fache Vergrößerung der Oberfläche der Protoplasten im Medium M_s mit 0,3 M Sorbit, eine 12-fache mit 0,4 M Sorbit und eine 7,4-fache mit 0,6 M Sorbit wohl nur mit einer Substanzneubildung erklären.

Im Vergleich zu Zellen haben Protoplasten aus alten Kalluskulturen eine neue Eigenschaft gewonnen: sie werden wesentlich größer als Zellen desselben Kallusstammes, d.h. sie können zu 'Riesenkugeln' heranwachsen, und das, weil sie anscheinend eine andere Eigenschaft verloren haben, die der normalen Zellteilung (s.u.).

Die oben geschilderten Ergebnisse ließen eine deutliche Abhängigkeit der Protoplasten von der Plasmolytikumkonzentration im Kulturmedium erkennen.

Es konnte festgestellt werden, daß im Falle zunehmender Konzentration des Plasmolytikums eine negative Korrelation besteht, und daß die Protoplastengröße zur Kulturdauer positiv linear korreliert ist (Fig. 14 und Fig. 15).

Damit stellen Protoplasten aus alten Kalluskulturen ein hoch empfindliches osmotisches System dar und könnten geeignete Objekte für die Untersuchung von Stoffaustauschvorgängen sein.

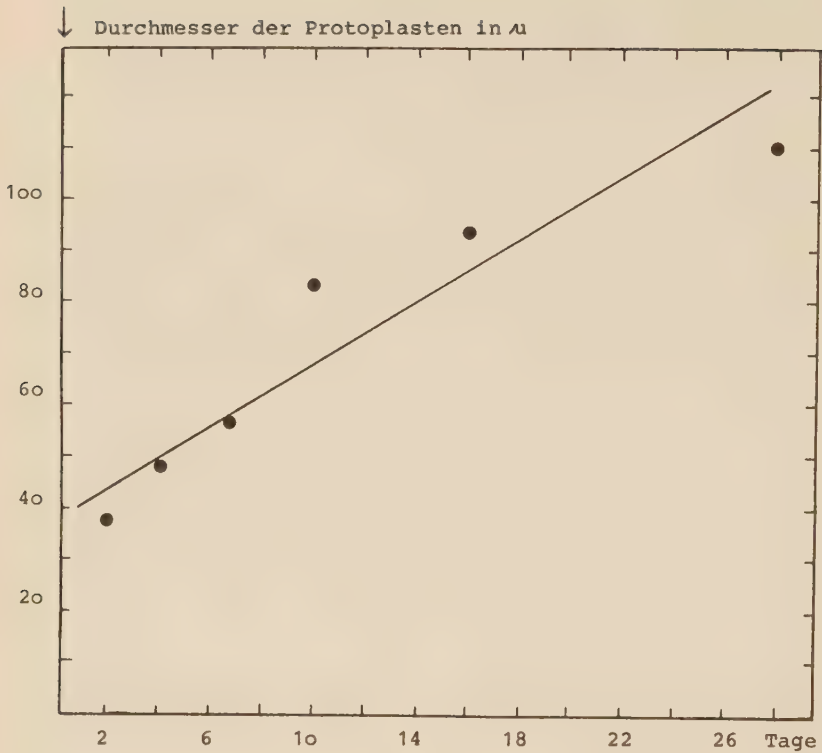


Fig. 14: Zunahme des Durchmessers der Protoplasten aus alten Kalluskulturen mit der Kulturzeit im Medium M_s mit 0,3 M Sorbit.

$$\text{Korrelationskoeffizient } r = \frac{\sum (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum (y_i - \bar{y})^2}}$$

$$r = \frac{1711,31}{\sqrt{567,27 \cdot 5705,75}} = 0,9508$$

gegenüber $r_{\text{tabelle}} = 0,8745$ für 1% Irrtumswahrscheinlichkeit

Regressionsgerade: $y = 37,33 + 30,1 x$

$$\text{Regressionskoeffizient } b_{y/x} = \frac{1711,31}{567,27} = 3,01$$

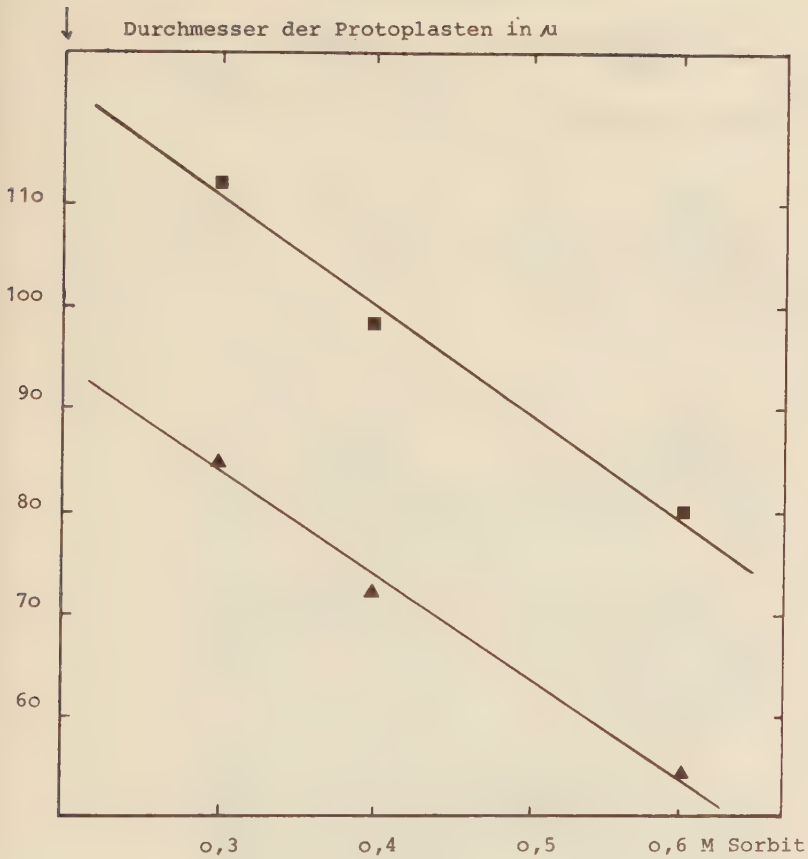


Fig. 15: Durchmesservergrößerung der Protoplasten aus alten Kalluskulturen in Abhängigkeit von der Plasmolytikumkonzentration. (Nährmedium M_s mit Sorbit).

Regressionsgerade für 10 Tage Kultur: $y = 93,55 - 3,35 x$ (▲)

Regressionsgerade für 28 Tage Kultur: $Y = 121,37 - 3,50 x$ (■)

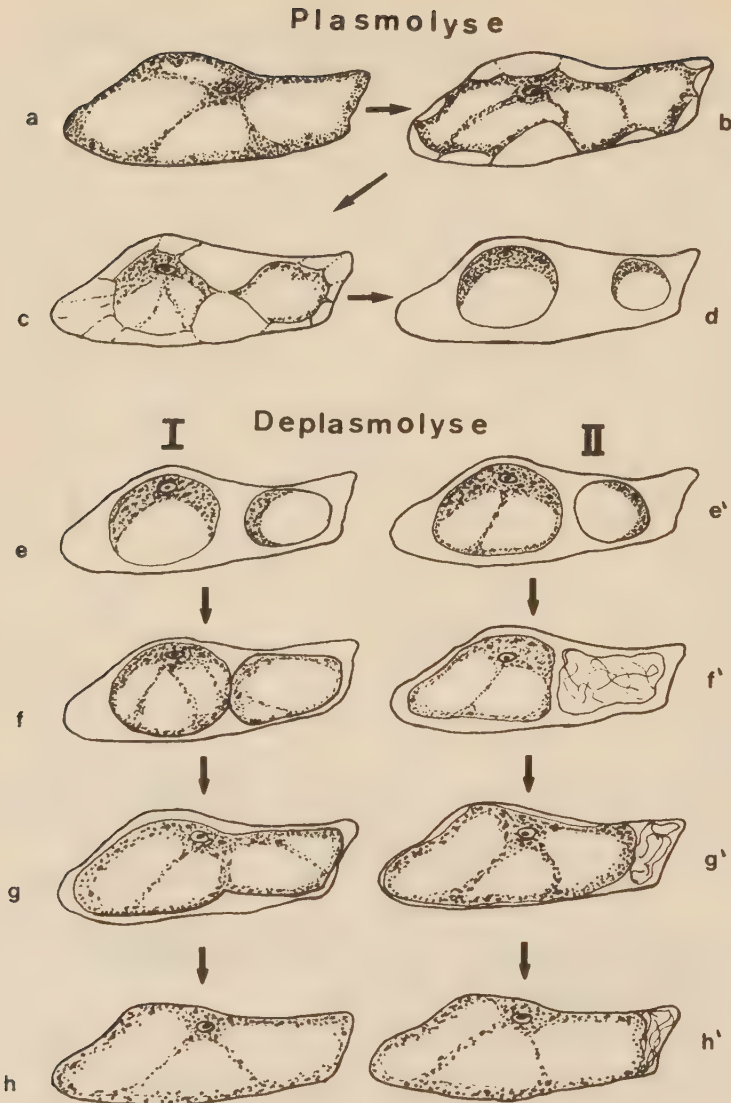


Abb.17: Schematische Darstellung eines Plasmolyse- (a-d) und Deplasmolysevorganges (e-h bzw. e'-h') an einer Einzelzelle. Entstehung zweier "Plasmatischen Einheiten" (d), Fall I (e-h) Fusion beider Einheiten nach Deplasmolyse, Fall II (e'-h') Ausdehnung der Einheit mit Kern, Absterben der anderen, es findet keine Fusion statt.

Fusionsfähigkeit

1) Fusion von plasmolysierten "Einheiten" innerhalb der Zellwand

Beim Überführen der Zellen in ein stark hypertonisches Medium, konnte es geschehen, daß eine lange parenchymatische Zelle in zwei oder mehrere "plasmatische Einheiten", sogenannte Subprotoplasten plasmolysierte (Abb.18 und Schema).

Viele dieser Subprotoplasten waren noch durch eine dünne Plasmabrücke miteinander verbunden. Es gab aber auch Zellen, bei denen im Phasenkontrastmikroskop keine Plasmafäden zwischen den Teilstücken erkannt werden konnten. Solche Zellen wurden ausgewählt, um zu überprüfen, ob die Teile ein und derselben Zelle bei Deplasmolyse wieder miteinander verschmelzen.



Abb.18: Plasmolysierte Zellen von Kalluskulturen von *Daucus carota*. a - sechs plasmatische Einheiten, die deutlich durch Plasmabrücken miteinander verbunden sind. b - fünf größere Subprotoplasten ohne gegenseitige Verbindung. (1 cm $\hat{=}$ 15 μ).

Die Plasmolyse erfolgte in 0,6 M Sorbitlösung, die Deplasmolyse wurde mit Leitungswasser eingeleitet. Nach 5-15 min waren alle Zellen vollständig plasmolysiert. Sofort nach Beginn der Deplasmolyse schollen die Subprotoplasten wieder an und fusionierten

Plasmolyse und Wandauflösung

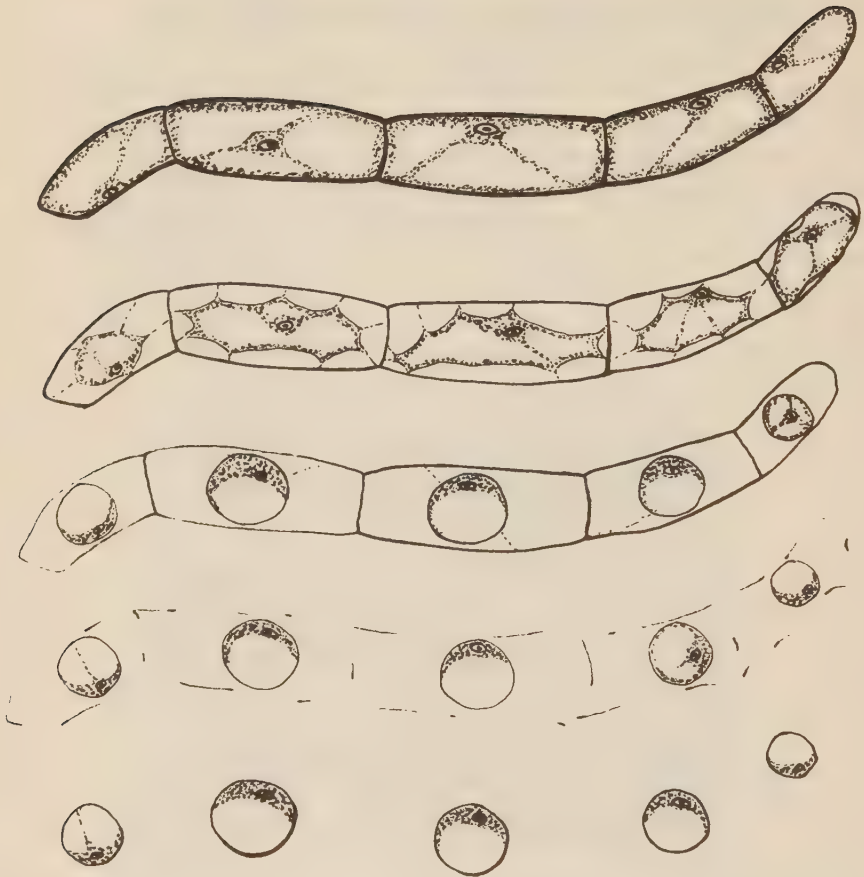


Abb.19 : Schematische Darstellung des Isolierungsprozesses von Protoplasten aus typischen Fadenzellen des alten Kallusgewebes. Bereits während der Plasmolyse brechen die Kontakte zwischen den Zellen ab.

ohne Schwierigkeiten miteinander. Anders verhielten sich die Teilstücke nach längerem Verweilen im Plasmolytikum. Nach 4-6 Stunden war es nur noch bei 50-70%, nach 7-9 Stunden nur noch an maximal 15% der getesteten Zellen möglich, die beiden Protoplastmehälften durch Deplasmolyse zur Fusion zu bringen. Nach 24 Stunden konnte so gut wie kein Verschmelzen der Subprotoplasten erreicht werden. Zwar dehnten sich die beiden Teile noch aus, blieben aber abgeplattet nebeneinander liegen, häufig ging auch der kernlose Subprotoplast zugrunde. Diese Ergebnisse sind mit denen von KÜSTER (1909) vergleichbar und zeigen deutlich, daß eine Fusionsbereitschaft nur kurze Zeit besteht. Wahrscheinlich treten durch die Plasmolyse Veränderungen am Plasmalemma ein, die eine Fusion verhindern.

2) Fusion von Protoplasten

a) spontane Fusion von Protoplasten des alten Kallusgewebes

Spontane Fusionen, d.h. Verschmelzung von Protoplasten ohne Einwirkung äußerer Faktoren wie mechanischer Druck oder Chemikalien, konnten bei Protoplasten aus altem Kallus bei wiederholter mikroskopischer Überwachung des Isolierungsprozesses nicht beobachtet werden. Bei diesem Gewebe lagen besonders stark vakuolisierte, lange Zellen vor, sodaß eine Behandlung mit 0,6 M Sorbit in den meisten Zellen zu einem raschen Abheben des Plasmabelages von den Wänden und einer völligen Abrundung der Protoplasten führte. Dadurch zerrissen nicht nur die Plasmaverbindungen mit der Zellwand, sondern auch die Plasmodesmen, sodaß eine wesentliche Voraussetzung für eine Fusion, nämlich die Verbindung zwischen den Protoplasten benachbarter Zellen, nicht mehr bestand (Abb.19).

Der Kontakt, der zwischen den sphärischen Protoplasten nach Auflösung der Zellwände zustande kommen konnte, reichte zu einer Fusion nicht mehr aus. Wahrscheinlich hatte sich in der relativ langen Inkubationszeit im Enzym und Plasmolytikum das Plasmalemma der Protoplasten verändert, ähnlich den Versuchen mit Subprotoplasten (s.o.).

Diese Beobachtungen wurden auch durch das weitere Verhalten der

Protoplasten unterstützt. Sie aggregierten im Laufe der Kultur so gut wie gar nicht, auch stärkere Adhäsionen von Protoplasten aneinander waren nicht festzustellen.



Abb.19: Plasmolysevorgang in typischen Fadenzellen der alten Gewebekulturen von *Daucus carota*. (1 cm $\approx$ 23 μ)

b) induzierte Fusion von Protoplasten des alten Kallusgewebes

Fusionen von Protoplasten aus alten Kalluskulturen zu induzieren, gelang nur im frisch isoliertem Zustand. Protoplasten, die älter als zwei Tage waren, waren unter keiner der getesteten Bedingungen mehr fusionsfähig. Damit bestätigten sich die oben gemachten Beobachtungen.

Zunächst wurde versucht, Protoplasten durch Deplasmolyse zur Fusion zu bringen. Dazu wurden Protoplasten in einer möglichst dichten Suspension auf einen Objektträger gebracht, sodaß sich bereits viele Protoplasten berührten, durch leichten Druck auf das Deckglas wurde der Kontakt zwischen den Protoplasten verstärkt und zusätzlich mit durchströmendem Wasser eine Deplasmolyse eingeleitet, die eine Vergrößerung der Protoplasten unter starker Ausdehnung der äußeren Membran zur Folge hatte. Unter zahlreichen Versuchen konnte nur zweimal eine Fusion von zwei Protoplasten (6 Stunden alt) beobachtet werden, die über eine Art "Achterstadium" zur kugeligen Form überging und anschließend platzte. Dieser Vorgang spielte sich innerhalb von knapp zehn Minuten ab (Abb.21).

Fusionen mit Hilfe von Natriumnitrat einzuleiten, wie es POWER et al. 1970 gelungen war, brachten nur Ergebnisse, die denen der Deplasmolyseversuchen entsprachen. Mehr Erfolg konnte mit einem anderen Versuch erzielt werden, indem Protoplasten in konditioniertem Medium bei 200 g 5 min zentrifugiert wurden, sie zeigten stärkere Aggregation und vereinzelt (1-2%) Fusionsfiguren. Nach einer Übertragung auf Agarmedium waren diese Fusionsprodukte aber nur wenige Tage lebensfähig (Abb.20).

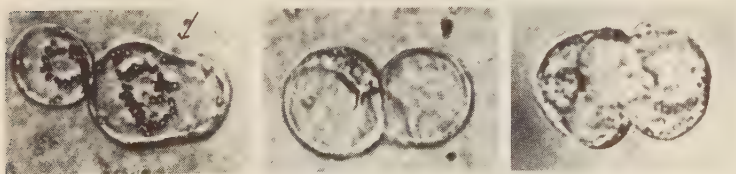


Abb.20: Fusionsfiguren von Protoplasten aus alten Kalluskulturen, induziert durch Zentrifugation in konditioniertem Medium M_s mit 0,3 M Sorbit. ($1\text{cm} \approx 18 \mu$).

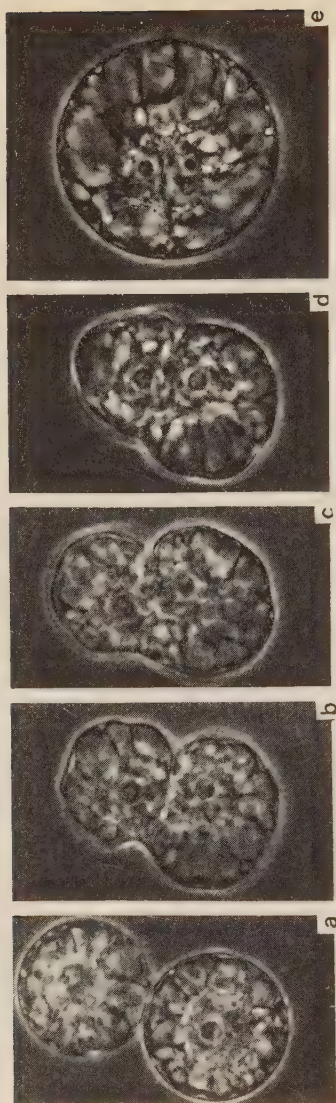


Abb.2: Induzierte Fusion zweier Protoplasten aus altem Kallusgewebe unmittelbar nach der Isolierung (a-e). Mechanischer Druck und schwache Deplasmolyse führten zu einem engen Kontakt der Protoplasten und danach zur Verschmelzung. Der Übergang vom "Achterstadium" zum Kugelstadium erfolgte innerhalb von zehn Minuten. Phasenkontrastaufnahmen. (1 cm $\approx$ 12 μ).

c) Fusionen von Protoplasten aus jungem Kallus

Weitere Versuche zur Fusion von Protoplasten wurden zum Vergleich mit dem jungen Kallus unternommen.

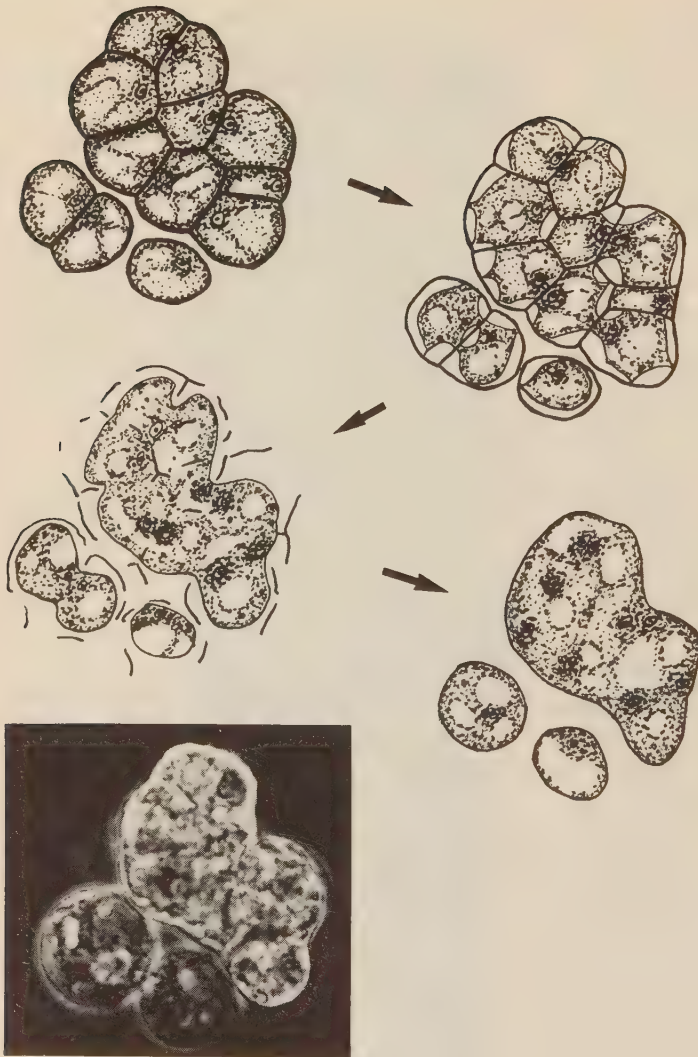
Protoplasten aus jungen Kalluskulturen zeigten eine erhöhte spontane Fusionsbereitschaft und waren bei Induktionsversuchen reaktionsfreudiger als Protoplasten aus altem Kallus. Der junge Kallus hatte überwiegend Aggregate aus kleinen, embryonalen Zellen, die in sehr engem Kontakt miteinander standen, der selbst bei starker Plasmolyse nicht abriß. Die meisten Zellen waren wenig vakuolisiert und lösten sich dadurch nur geringfügig von der Wand ab. Unter diesen Voraussetzungen konnten bereits während der Isolierung, aber auch noch nach dem Waschen der Protoplasten zahlreiche typische spontane Fusionen beobachtet werden. Selten fusionierten nur zwei Zellen bzw. Protoplasten miteinander, meistens waren es ganze Aggregate, deren Zellen nach Abbau der Zellwände verschmolzen und riesige Fusionsprodukte bildeten, welche von einer gemeinsamen äußeren Membran umhüllt und zunächst relativ stabil waren (Abb22).

Wenn die Protoplasten aus den jungen Kallussuspensionen in der verdünnten Enzymlösung verblieben, konnten Fusionen auch über einen längeren Zeitraum d.h. über zwei Tage nach der Isolierung erfolgen. Für eine Kultivierung waren die Fusionsprodukte aber ungeeignet.

Die Fusionsbereitschaft der Protoplasten konnte weiterhin durch konditioniertes Medium M_s , aber auch durch Zugabe von verdünnten Salzlösungen ($NaNO_3$, KCl) gesteigert werden.

Den bisher stärksten Effekt hinsichtlich Aggregation und Fusion von Protoplasten hatten Lösungen mit erhöhtem pH-Wert (pH 9) und Zusatz von $0,05\text{ M CaCl}_2$ (modifizierte Methode von KELLER et al. 1973), denn die Zahl isoliert bleibender Protoplasten ging auf durchschnittlich 20-35% zurück.

Es konnte somit nachgewiesen werden, daß die Fähigkeit zur Fusion von der Zeit nach der Isolierung abhängt, und daß eine Induktion von Fusionen grundsätzlich möglich ist, wobei neben der Deplasmolyse, der Veränderung des pH-Wertes, auch möglicherweise noch unbekannte Komponenten des konditionierten Mediums



Darstellung des Isolierungsprozesses von Protoplasten aus kleinen Aggregaten embryonaler Zellen. Entstehung von spontanen Fusionsprodukten, gleichzeitig aus mehreren Protoplasten. (Phasenkontrastaufnahme, $1\text{ cm} \approx 13\text{ }\mu$).

zur Verschmelzung der Membranen in unterschiedlicher Art beitragen.

Weiterhin konnte festgestellt werden, daß Protoplasten aus jungem Kallus eindeutig fusionsbereiter waren, als Protoplasten aus altem Kallus, und daß unter diesen Bedingungen hauptsächlich Fusionsprodukte entstanden, die aus mehreren Zellen bzw. Protoplasten bestanden, die für eine erfolgreiche Kultivierung bisher wenig geeignet waren.

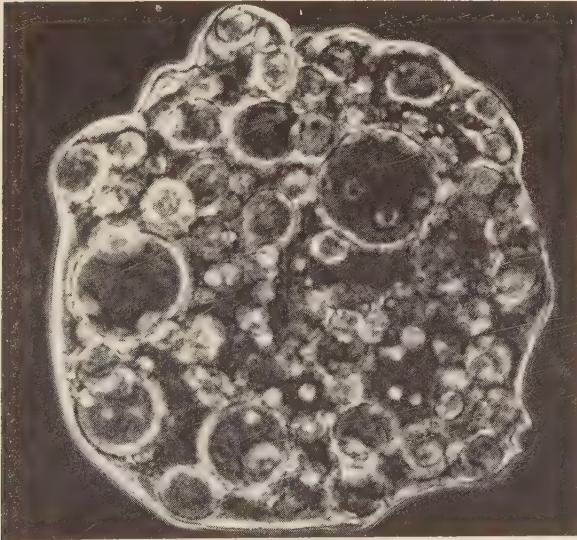


Abb.23 : Riesiges Fusionsprodukt, das während der Isolierung aus vielen kleinen, embryonalen Zellen des jungen Kallusgewebes entstanden ist. Phasenkontrastaufnahme, ($1\text{ cm} \approx 10\ \mu$).

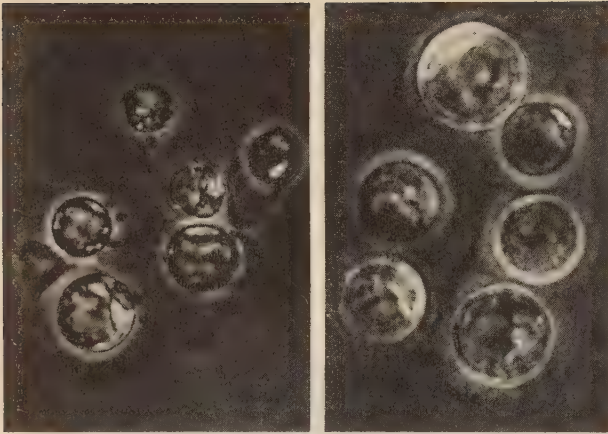


Abb.24: Zellwandauflösung bei Suspensionskulturzellen von *Daucus carota* im Medium M₂ mit 0,6 M Sorbit und 5% Cellulase. Die Zellwände werden unterschiedlich schnell abgebaut.
Phasenkontrastaufnahmen: (a) $1\text{cm} \approx 18 \mu$, (b) $1\text{cm} \approx 15 \mu$.

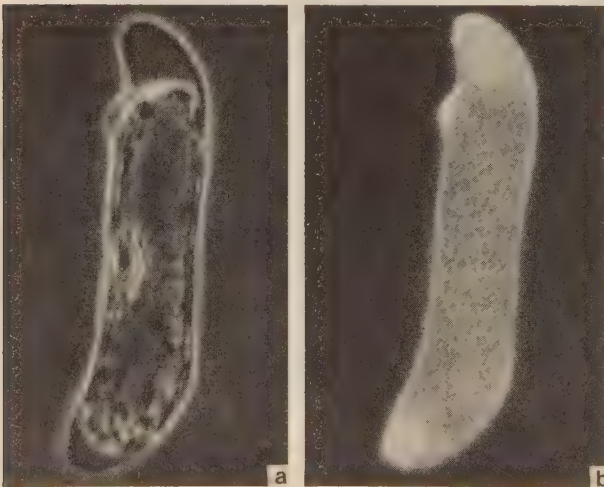


Abb.25: Plasmolysierte Kalluszeile von *Daucus carota*. (a) Phasenkontrastaufnahme, (b) Fluoreszenzaufnahme derselben Zelle nach Färbung mit Calcofluor. $1\text{cm} \approx 18 \mu$

Zellwandregenerationsfähigkeit

Da die Art des Zellwandabbaues möglicherweise Anhaltspunkte für die Regenerationsfähigkeit der Zellwand geben konnte, wurde zunächst der Prozeß der Wandauflösung genau beobachtet. Es ließen sich vor allem zwei Arten des Wandabbaues unterscheiden: a) gleichmäßiges rundum "Dünner-werden" bis zur völligen Auflösung der Zellwand und b) schneller Schwund einzelner Partien der Zellwand, wobei Außen- und Innenwände (Verbindungen zwischen zwei oder mehreren Zellen) ohne bestimmte Gesetzmäßigkeit unterschiedlich schnell von dem Enzym angegriffen wurden (Abb. 24).

Der Zellwandabbau konnte an Zellen des alten Kallusgewebes besonders gut verfolgt werden, da die Zellwand freilag, weil die stark vakuolisierten Zellen in plasmolysiertem Zustand völlig abgekugelte Protoplasten hatten. Untersuchungen im Phasenkontrast zeigten, daß die Enzymbehandlung zum vollständigen Abbau der Zellwände führte.

Schwieriger dagegen waren die Beobachtungen bei embryonalen Zellen und größeren Zellaggregaten, wie sie vor allem in jungem Kallus vorkamen, da bei Plasmolyse der Plasmabelag sich nicht immer völlig von der Wand ablöste. Es war daher nicht auszuschließen, daß größere Teile der Zellwand im Verlauf der Isolierung am Plasmalemma der Protoplasten haften blieben und andere möglicherweise inkorporiert wurden.

Eine interessante Nebenbeobachtung konnte immer wieder gemacht werden: die Wand toter Zellen blieb bei der enzymatischen Spaltung wesentlich länger erhalten als bei lebenden Zellen.

Zur Überprüfung, ob es sich wirklich um sogenannte "nackte" Zellen, d.h. wandlose Protoplasten handelte, aber auch zum Nachweis einer Regeneration der Zellwand, wurden verschiedene Kriterien herangezogen:

- a) Fluorochromierung mit Calcofluor White ST, nach der Methode von NAGATA und TAKEBE (1970). Dieser Fluoreszenzfarbstoff hat eine starke Affinität zu Cellulose und läßt die Zellwände grünlich-bläulich aufleuchten. (Abb. 25)

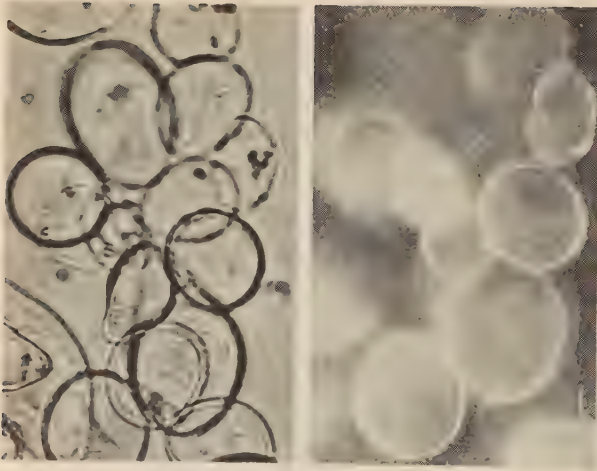


Abb.26: Protoplasten aus jungen Kalluszellen nach einer Woche Kultur auf dem Medium M_s mit 0,3 M Sorbit. (a) Hellfeldaufnahme, (b) Fluoreszenzaufnahme derselben Protoplasten nach Fluorochromierung mit Calcofluor. ($1\text{cm}^2 \approx 16 \mu$).

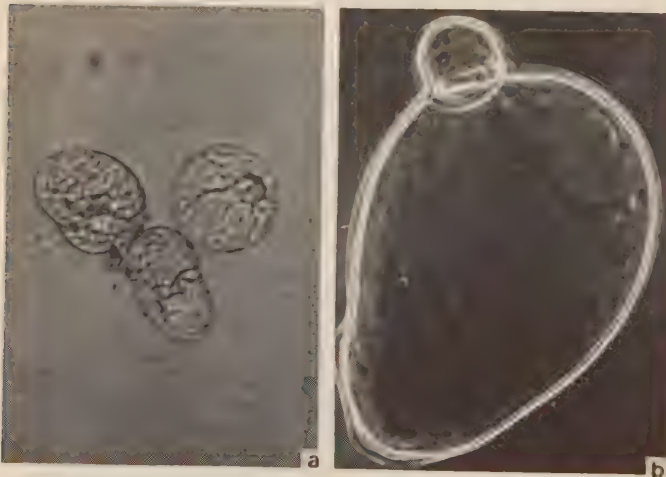


Abb.27: (a) Auftreten ovaler Form bei Protoplasten aus jungen Kalluskulturen als Hinweis auf eine Wandregeneration nach sechs Tagen Kultur in M_s mit 0,3M Sorbit ($1\text{cm}^2 \approx 15 \mu$), (b) "Budding"-Beginn bei einem Protoplasten aus jungem Kallus auf 0,4%igem Agarmedium M_s mit 0,3 M Sorbit ($1\text{cm}^2 \approx 5 \mu$).

- b) Formveränderung der Protoplasten von der Kugelform zur Eiform (KAO et al. 1970).
- c) Polarisationsoptische Analyse der charakteristischen Doppelbrechung der Cellulose
- d) Plasmolyse- und Deplasmolyseversuche.

Frisch isolierte, lebende Protoplasten fluoreszierten nicht, zeigten keine typische Doppelbrechung der Zellwand, platzten schnell bei stärkerer Deplasmolyse und waren von sphärischer Form.

Während Protoplasten aus den alten Kalluskulturen innerhalb einer dreiwöchigen Kulturdauer in Suspension ihre kugelige Form beibehielten, traten bei Protoplasten aus jungem Kallus drei Tage, spätestens sechs Tage nach der Isolierung ovale Formen auf (Abb.27). Gleichzeitig entstanden zusammenhängende Aggregate, die teilweise mit Calcofluor fluoreszierten (Abb.26), und zwar in Medium M_S mit 0,3 und 0,4 M Sorbit zu durchschnittlich 20% mehr als in Medium M_S mit 0,6 M Sorbit, sodaß ein Einfluß der Plasmolytikumkonzentration auf die Wandregeneration wahrscheinlich ist (Fig.16).

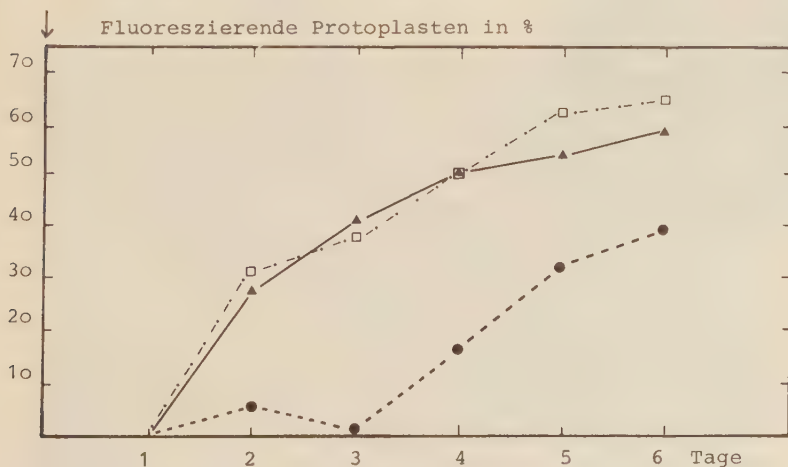


Fig.16: Zunahme fluoreszierender Protoplasten mit der Kulturdauer. Die Fluoreszenz mit Calcofluor White St wird als Indikation einer sich regenerierenden Zellwand angesehen (NAGATA et al. 1970). Die Kulturmedien waren M_S mit Sorbit in Konzentrationen von 0,3M —, 0,4M --- und 0,6 M ---

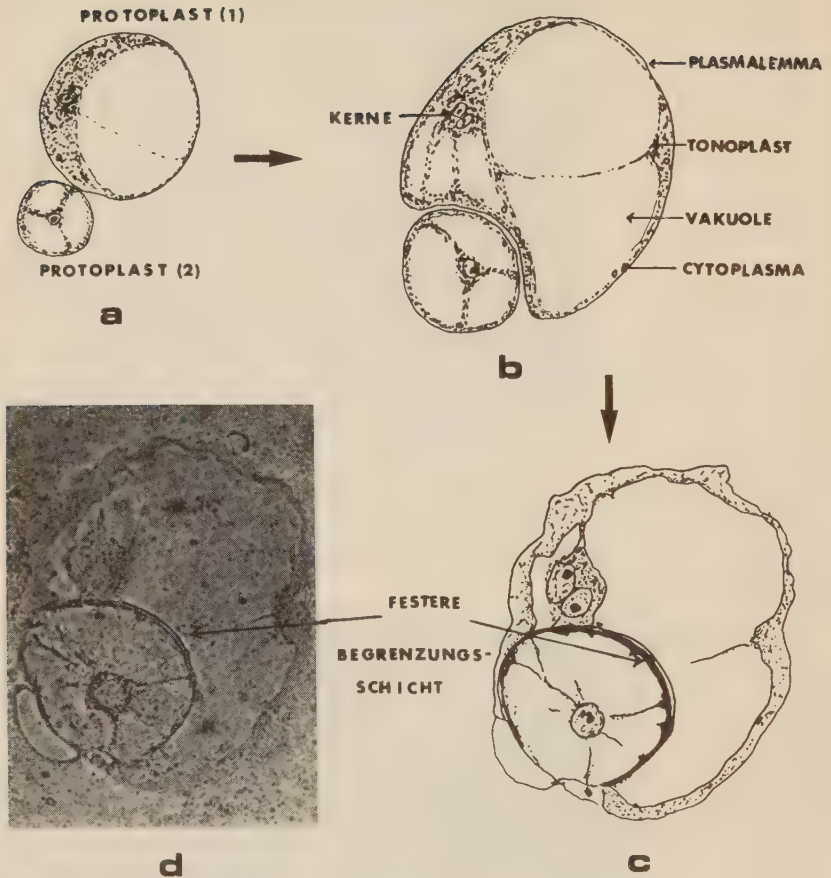


Abb.28: Schematische Darstellung des "Zerfließens" von Protoplasten auf Agar. (a) zwei unterschiedlich große Protoplasten, der 1. wahrscheinlich nach einer Kernteilung hat ungleichmäßig verteiltes Cytoplasma zu einer Seite hin, beim 2. liegt der Kern zentral, Plasmafäden überziehen den gesamten Protoplasten (b) Protoplast 1 und 2 kommen in Kontakt, Protoplast 1 beginnt sich stark auszudehnen und umfließt Protoplast 2. (c) Fortschreiten der Ausdehnung der Protoplasten, Entstehung einer festeren Begrenzungsschicht nur im gegenseitigen Berührungsbereich. (d) Photographische Abbildung des Stadiums c. Eine Woche alte Protoplasten auf dem Agarmedium M_S mit 0,4 M Sorbit. (1 cm $\approx$ 10 μ).

Außer den Protoplasten in Flüssigmedien wurden zusätzlich Protoplasten untersucht, die auf 0,4%igen Agarplatten mit Medium M_5 und 0,3 M Sorbit kultiviert worden sind.

Protoplasten aus altem Kallus "zerflossen" in Kontakt mit dem Agar, d.h. dehnten sich unregelmäßig weit aus und zeigten damit eine Flexibilität der äußeren Begrenzungsschicht, wie sie wohl kaum von einer echten Zellwand erreicht werden könnte. Solche Protoplasten wuchsen ohne sich zu teilen zu den bereits oben erwähnten deformierten "Gebilden" heran. Nur zwischen sich berührenden Protoplasten formte sich eine festere Begrenzungsschicht (Abb.28).

Protoplasten aus jungem Kallus-mit Ausnahme größerer Fusionsprodukte- hatten dagegen keine Tendenz sich in dieser Weise auszudehnen, sondern zeigten vorrangig auf Agarmedium das sogenannte "budding" (HORINE et al. 1972), vereinzelt wurden auch Formen gefunden, die eine oder mehrere Zellteilungen durchgemacht hatten (Abb.30). Nach drei wöchiger Kultur hatten sich auf den Agarplatten kleine Kalluskolonien gebildet.

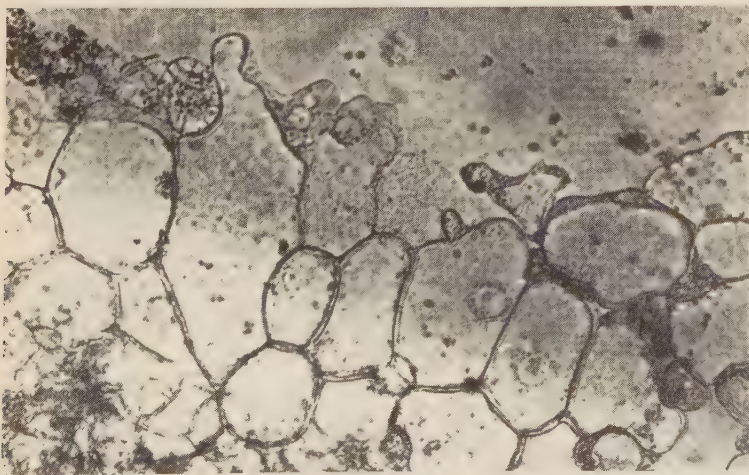


Abb.28 Protoplasten aus alten Kalluskulturen auf Agarmedium. Begrenzungsschichten der einzelnen Protoplasten außen sehr dünn und unregelmäßig verformt, innen im Kontakt mit anderen Protoplasten stärkerer. (1 cm $\approx$ 15 μ)

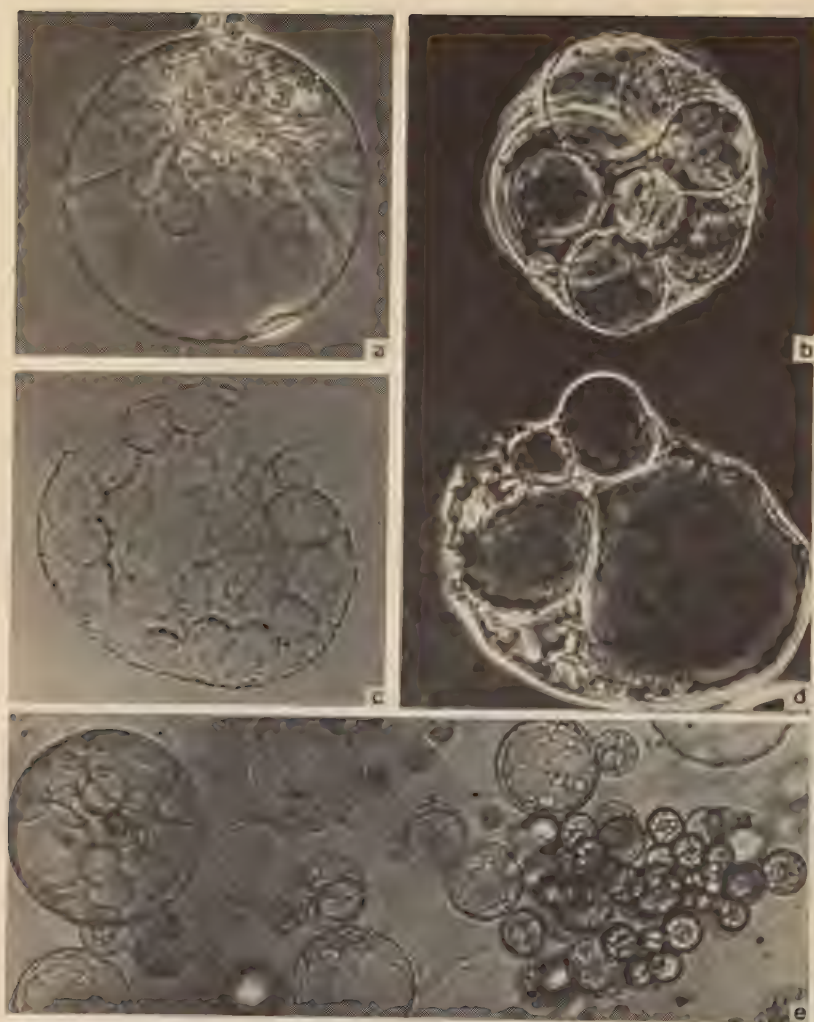


Abb.29: Zerfall von Protoplasten aus alten Kalluskulturen von *Daucus carota* im Verlauf längerer Kulturdauer. a: vom Kernbereich ausgehend Ausstülpungen von Membranen und Abschneidung kleiner Einheiten nach außen (Pfeil). b: Abknäueln solcher Membranen bis zur Deformierung der sphärischen Form des Protoplasten. c,d: gequetschte Präparate zur Sichtbarmachung der Plasmabereiche (1 cm $\approx$ 11 μ). e: Übersichtsbild solcher Stadien in einer zwei Monate alten Protoplastensuspension (1 cm $\approx$ 15 μ).

In älteren Protoplastensuspensionen (2 Monate) konnte regelmäßig beobachtet werden, daß neben sehr großen Protoplasten auffallend viele besonders kleine (unter $20\ \mu$) auftraten, die in Gruppen locker zusammenhingen und im Laufe der Zeit an Grösse zunahmen. Es handelt sich dabei anscheinend um den Zerfall großer Protoplasten in Teil- oder Untereinheiten.

Abb. 29 zeigt verschiedene Stadien von Protoplasten, die solch einem Zerfall vorangehen. Es sind meist große Protoplasten mit einer Vielzahl von Vakuolen, von denen jede für sich von einem Plasmabelag umgeben ist und den Eindruck einer stärkeren Kompartimierung vermittelt. Aus solchen Protoplasten können sich shärische, stark lichtbrechende, sehr kleine Teilstücke abschnüren, es kann aber auch der gesamte Protoplasten in mehrere Einheiten kugeligter Form zerfallen.

Ob dies eine Vermehrungsform unter zellwandlosen Bedingungen ist und in wie weit bestimmte Oberflächen-Volumenrelationen dafür verantwortlich sind, müßte cytologisch näher untersucht werden.

Möglicherweise sind Parallelen zu den "budding" Erscheinungen auf Agar zu ziehen, die in Suspension in der oben beschriebenen Art ablaufen.

Eine weitere cytologisch interessante Beobachtung, die möglicherweise ebenfalls im Zusammenhang mit der Wandlosigkeit und verstärkten Membranbildung steht, ist das Auftreten von Fett in diesen alten Kulturen gewesen, das mit Sudan IV nachgewiesen wurde. Die Fettproduktion war dermaßen stark, daß ganze Fetttropfen ausgeschieden wurden und sich als "Fettaugen" auf der Oberfläche der Suspensionslösung ansammelten.

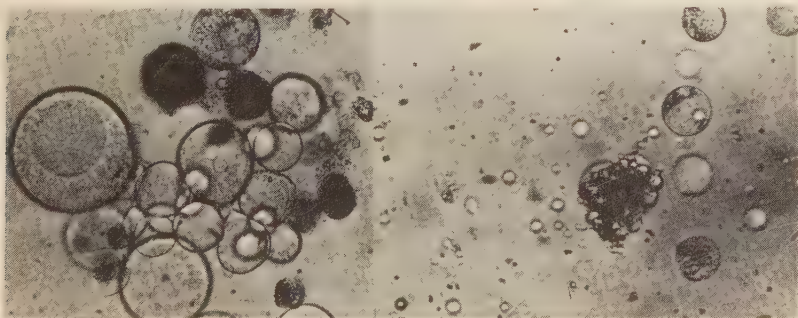


Abb. 29a: Ausscheidung von Fetttropfen aus Protoplasten aus alten Kalluskulturen von *Daucus carota*. ($1\text{cm} = 56\ \mu$).



Abb.30: Teilungen von Protoplasten aus jungem Kallusgewebe nach Regeneration einer Zellwand im Nährmedium M_2 mit 0,3 M Sorbit.

(a) Fluoreszierender "Protoplast" nach Behandlung mit Calcofluor im Stadium nach der ersten Zellteilung, sechs Tage alt, (b,c,d) mehrfachgeteilte "Protoplasten" nach zehn Tagen Kultur (Hellfeld)

(a: $1\text{cm} \approx 4\ \mu$; b,c: $1\text{cm} \approx 17\ \mu$; d: $1\text{cm} \approx 10\ \mu$)

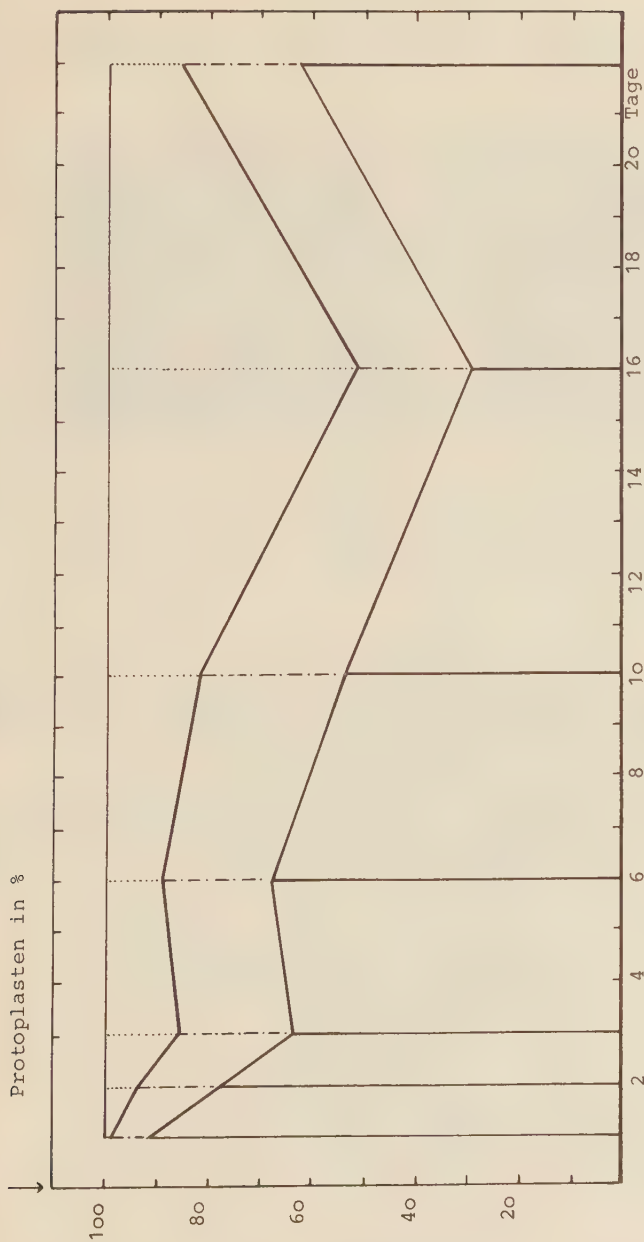


Fig. 17: Veränderung des prozentualen Anteils von Protoplasten aus alten Kalluskulturen mit einem (—), zwei (---) und mehreren (.....) Kernen während einer 22 tägigen Kultur im Flüssigmedium M_5 mit Sorbit als Plasmolytikum.

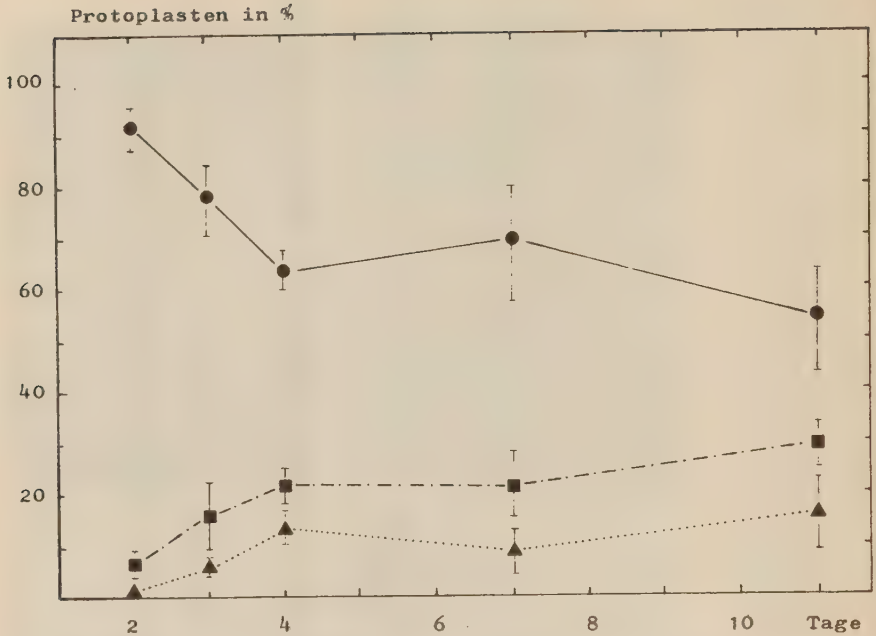


Fig.18: Häufigkeit in Prozent der Protoplasten mit einem (●—●) zwei (■—■) und mehreren (▲···▲) Kernen während einer Kulturperiode von elf Tagen im Medium M₃ mit Sorbit als Plasmolytikum. Angabe der Vertrauenswahrscheinlichkeit von 99%. Die Auszählung erfolgte anhand von Orcein-Fertigpräparaten.

Als signifikant verschieden wurden diejenigen Werte angesehen, deren t - eine nach STUDENT verteilte Größe - den in der Tabelle zu den entsprechenden Freiheitsgraden angegebenen Wert bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% überschritten hatte.

Als Beispiel sei der 2. und 3. Tag angeführt:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{\sum (x_{11} - \bar{x}_1)^2 + (\sum x_{12} - \bar{x}_2)^2}{n_1 + n_2 - 2}}} \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}}$$

$t_{\text{Tabelle}} = 3,012$ (für 13 Freiheitsgrade bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1%)

$$\text{Einkernige: } t = \frac{92 - 78}{\sqrt{\frac{52 + 184}{6 + 9 - 2}}} \cdot \sqrt{\frac{6 \cdot 9}{6 + 9}} = 1,897 = 6,234$$

$$\text{Zweikernige: } t = \frac{16,11 - 6,33}{\sqrt{\frac{17,33 + 206}{13}}} \cdot 1,897 = 4,287$$

$$\text{Mehrernige: } t = \frac{5,89 - 1,67}{\sqrt{\frac{7,33 + 10,9}{13}}} \cdot 1,897 = 5,864$$

Teilungsfähigkeit

Schon zu Beginn der Untersuchungen waren Protoplasten mit mehreren Kernen aufgefallen (HELLMANN und REINERT 1971).

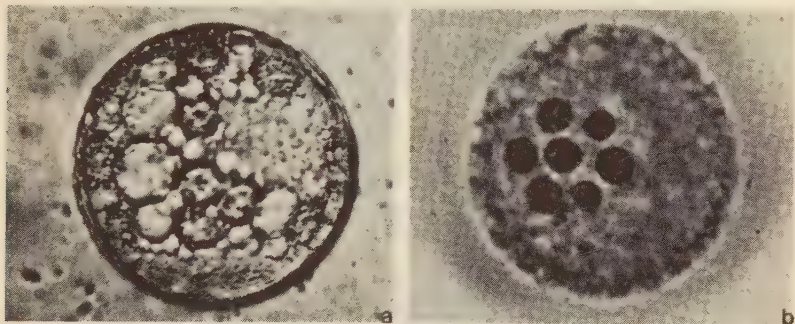


Abb.32a: Protoplasten aus über sechs Jahre alten Kalluskulturen von *Daucus carota*. (a) Lebender Protoplast mit mindestens zehn Kernen 14 Tage nach der Isolierung ($1\text{ cm} = 14\text{ }\mu$). (b) Fixierter und mit Orcein gefärbter Protoplast mit sieben Kernen 16 Tage nach der Isolierung ($1\text{ cm} \approx 12\text{ }\mu$).

Der folgende Versuch sollte klären helfen, wie diese Vielkernigkeit der Protoplasten zustandekommt.

Gleichzeitig mit den Protoplasten wurden unbehandelte Zellen und plasmolysierte Zellen aus demselben alten Kallusgewebe über einen längeren Zeitraum kultiviert; aus Stichproben dieser Suspensionen wurden zu Beginn des Versuches, nach der Isolierung und in bestimmten Intervallen Orcein-Fertigpräparate hergestellt und die Anzahl Kerne pro Zelle bzw. Protoplast bestimmt.

Die Zählungen ergaben, daß die Zellen, aus denen die Protoplasten isoliert worden waren, in der Regel einkernig waren. 20 Stunden nach der Enzymbehandlung waren auch die meisten Protoplasten noch einkernig. Nur in wenigen Fällen kamen einen Tag später zweikernige und noch seltener mehrkernige Protoplasten vor. Die Kernverhältnisse während längerer Kulturperioden geben die Figuren 17 und 18 wieder. In Fig. 19 ist die Zahl der Protoplasten mit ein, zwei und mehr Kernen nach dem zweiten, vierten und elften Tag in den drei Medien mit ver-

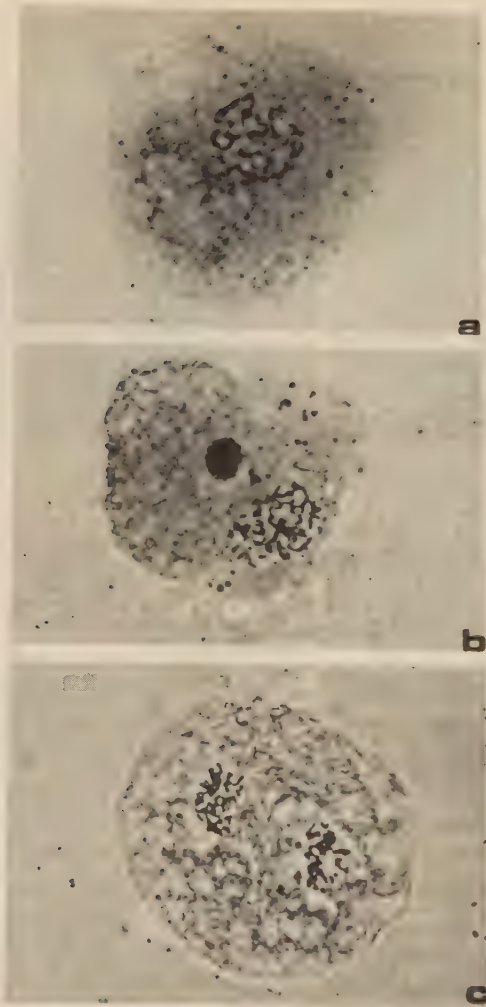


Abb.31: Kernteilungen in Protoplasten aus alten Kalluskulturen von *Daucus carota*. Orcein-Fertigpräparate. (a) 2 Tage alt, $1\text{cm} \approx 6\ \mu$. (b) asynchrone Kernteilungen, 14 Tage alt, $1\text{cm} \approx 10\ \mu$. (c) synchrone Teilung zweier Kerne, 10 Tage alt, $1\text{cm} \approx 14\ \mu$.

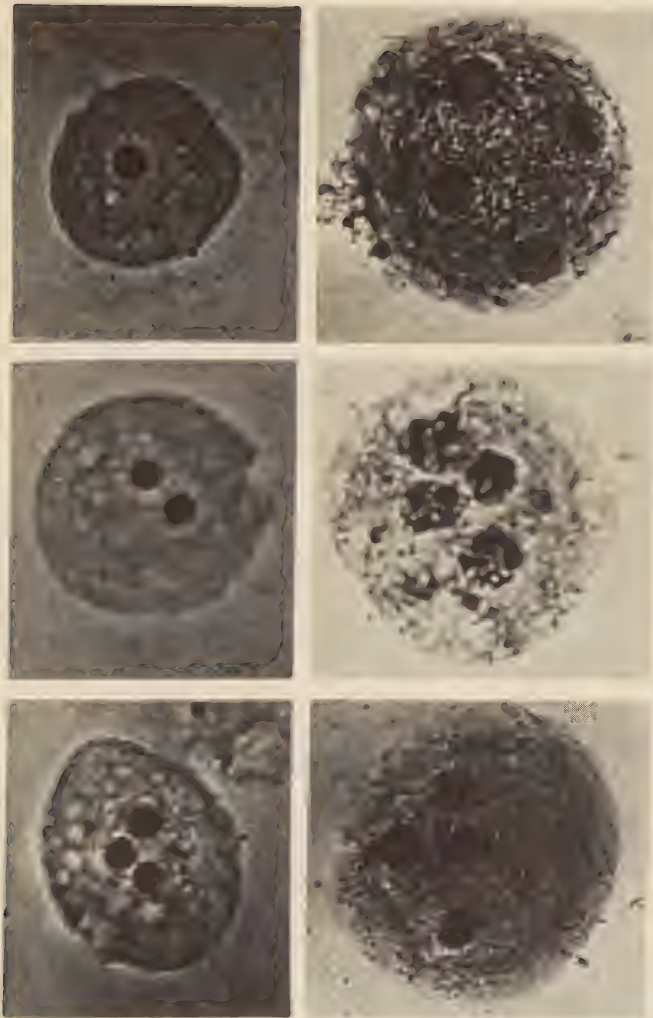


Abb.32 b Fixierte und mit Orcein gefärbte Protoplasten aus alten Suspensionskulturen von *Daucus carota* mit 1 bis 4 Kernen nach einer 14 tägigen Kultur im Medium M_s mit 0,6 M Sorbit.

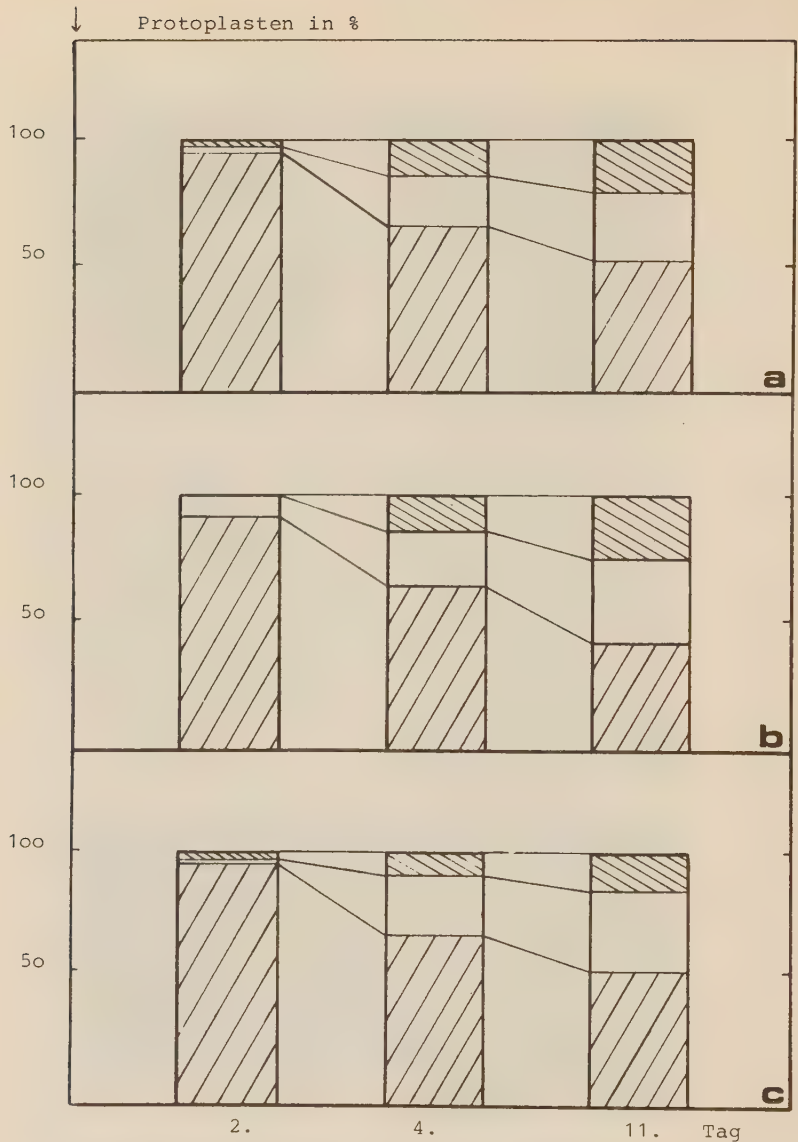


Fig.19: Prozentualler Anteil von Protoplasten mit einem , zweit  und mehreren  Kernen am zweiten, vierten und elften Tag im Medium M₆ mit (a) 0,3 M Sorbit, (b) 0,4 M Sorbit und (c) 0,6 M Sorbit.

schieden hoher Plasmolytikumkonzentration dargestellt. In jedem Fall und -auffallenderweise auch unabhängig von dem Sorbitzusatz-, haben die einkernigen Protoplasten im Laufe der Zeit abgenommen, und die Zahl zwei- und mehrkerniger Protoplasten ist angestiegen. Die Prüfung erfolgte mit dem F- und t-Test.

Bei der Auswertung der Präparate wurden außerdem am ersten und zweiten Tag besonders viele Protoplasten mit Kernteilungsstadien festgestellt, in dem meisten Fällen handelte es sich um späte Prophasen. Solche Teilungsfiguren traten vermehrt auch am sechsten und besonders zehnten Tag auf (Abb. 31).

In der Mehrzahl teilten sich die Kerne gleichzeitig, seltener wurden asynchrone Kernteilungen gefunden, die jedoch das Auftreten ungerader Kernanzahlen wie z.B. drei und sieben je Protoplast erklären. Unter den mehrkernigen Protoplasten waren die vierkernigen am häufigsten vertreten (Abb.32), die höchste absolute Kernzahl lag bei 13.

Bei Untersuchungen der unbehandelten Zellen und plasmolysierten Zellen stellte sich heraus, daß Kernteilungen in diesen alten Kalluszellen in einem überaus hohem Grade synchron verlaufen, denn es konnten zwei Tage nach Überführung in frisches Medium, d.h. zum gleichen Zeitpunkt wie bei den Protoplasten, durchschnittlich 70% Zellen in teilungsaktivem Stadium-Abb.33-34 verdeutlicht es- gefunden werden. Solche Stadien traten im Verlauf der Kultur erst wieder zwischen dem achten und zehnten Tag auf. Bei plasmolysierten Zellen lagen in einigen Fällen zwei Tage nach Mediumwechsel zwei Kerne je plasmolysierte Einheit vor (Abb.35), sodaß möglicherweise Parallelen zum Verhalten der Protoplasten gezogen werden können.

Diese Ergebnisse zeigen, daß der Kernteilungsmechanismus in den Protoplasten ungestört erhalten bleibt, und die Vielkernigkeit in erster Linie dadurch zustandekommt, daß keine nachfolgende Teilung des gesamten Protoplasten einsetzt. Damit scheint die vollständige Teilungsfähigkeit im Sinne einer normalen Zellteilung dieser wandlosen Protoplasten nur in Zusammenhang mit einer Zellwandbildung erfolgen zu können.

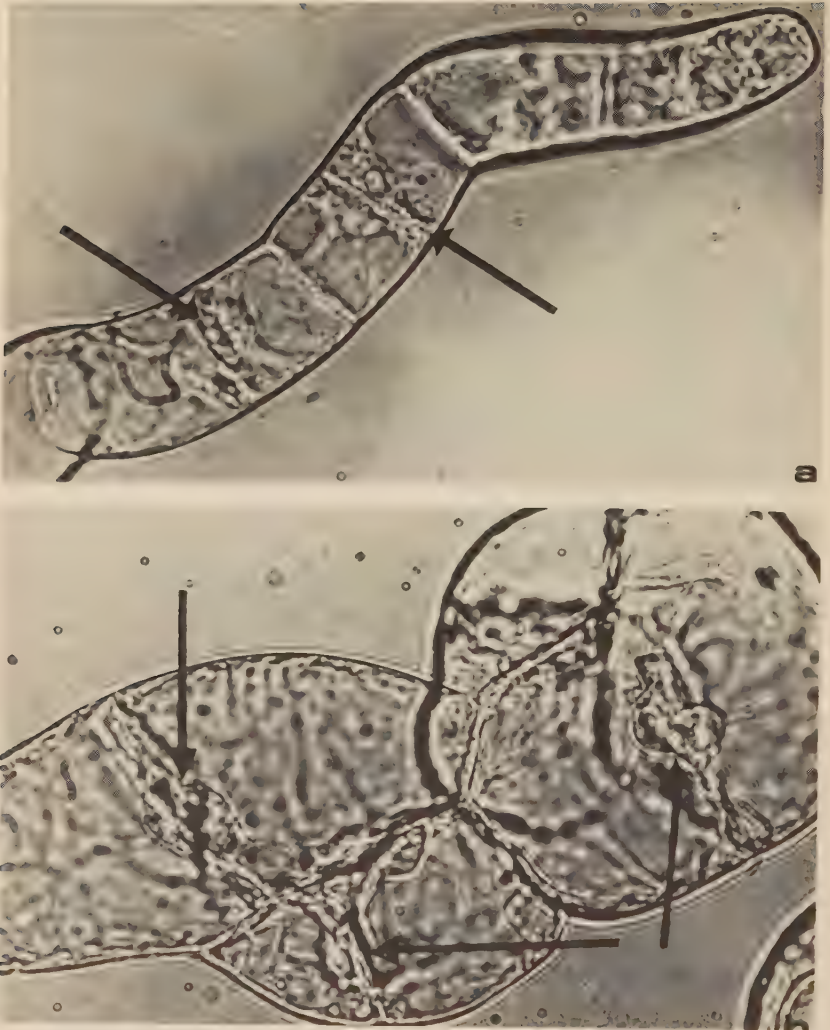


Abb 33 Alte Kalluszellen von *Daucus carota* zwei Tage nach Überführung in frisches Medium in synchron-teilungsaktivem Zustand, kenntlich an der Lage der Kerne und Neubildung der Wand, siehe Pfeile. (a) $1\text{cm} \approx 11 \mu$, (b) $1\text{cm} \approx 5 \mu$.



Abb.34. Fixierte und mit Orcein gefarbte Zellen aus alten Suspensionskulturen von *Daucus carota*. Zwei Tage nach Überführung in frisches Medium sind fast alle Zellkerne im Stadium der Prophase ($1\text{ cm} \approx 15 \mu$).



Abb.35. Alte Kalluszellen nach zwei Tagen im Medium M_8 mit 0,4 M Sorbit mit zwei Kernen je plasmolysierte Einheit. (Orcein-Färbung) ($1\text{ cm} \approx 7 \mu$).

DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit gehört in den Rahmen von Untersuchungen über Differenzierung und Morphogenese an Kalluskulturen von *Daucus carota*, wie sie seit 1958 von REINERT durchgeführt werden.

Viele Arbeiten haben sich mit dem Einfluß äußerer Faktoren auf die Organogenese befaßt. (REINERT, BACKS und KROSING 1966, REINERT, TAWAZA und SEMENOFF 1967 u.a.) Dabei hat sich herausgestellt, daß Gewebekulturen im Verlauf längerer Subkultur ihre Fähigkeit verlieren, Embryonen oder Wurzeln zu regenerieren (REINERT et al. 1970, MEYER-TEUTER und REINERT 1973, WITHERS et al. 1974). Es ist bisher noch nicht geklärt worden, ob das Erlöschen der Regenerationsfähigkeit auf reversiblen Änderungen spezieller Kompetenzen der Kalluszellen oder auf einem irreversiblen Verlust bestimmter genetischer Information beruht.

Zur Klärung dieses Problems sind homogene Kalluszellen und geeignete Techniken zum Erfassen auch geringster Zellunterschiede wünschenswert. Eine gute Möglichkeit, Gewebekulturzellen zu trennen, um sie individuell zu untersuchen, könnte sich durch die Isolierung von Protoplasten ergeben.

Aus den oben geschilderten Gründen sind in dieser Arbeit für die Isolierung von Protoplasten Kalluskulturen mit unterschiedlicher Regenerationsfähigkeit gewählt worden. Während sich der erste Teil der Arbeit mit den Problemen der Isolierung und Kultivierung der Protoplasten befaßt, widmet sich der zweite Teil den Eigenschaften dieser Protoplasten. Dabei werden Protoplasten aus einem alten Kallusstamm mit Protoplasten aus jungen Kalluskulturen verglichen, aber auch Zellen und plasmolysierte Zellen mit den entsprechenden Protoplasten.

Das Hauptproblem bei der Isolierung von Protoplasten besteht darin, die Zellwände zu beseitigen, ohne die Zellen selbst zu schädigen.

Daher müssen die Faktoren wie Enzym, Osmotikum, pH-Wert, Temperatur, Inkubationszeit, von denen eine Isolierung abhängt, einzeln untersucht werden. Es zeigt sich dabei, daß die optimalen Bedingungen je Pflanzermaterial sehr unterschiedlich ausfallen können.

Die eigenen Versuche zeigen keine eindeutigen Unterschiede in der Vitalität der Protoplasten, gleichgültig ob sie vor oder während der Plasmolyse mit dem wandspaltendem Enzympräparat behandelt werden. Dagegen läßt sich beobachten, daß der Abbau der Zellwände bei vorplasmolysierten Zellen verzögert ist, sodaß eine Beteiligung des Plasmalemmas bzw. des Cytoplasmas bei der Wandauflösung nicht ausgeschlossen ist. Das würde auch erklären, wieso die Zellwände toter Zellen kaum oder gar nicht aufgelöst werden.

Der eigentlich für die Beseitigung der Zellwand verantwortliche Faktor ist das Enzympräparat. Die gebräuchlichsten Enzyme sind Pektinasen und Cellulasen, von denen die Präparationen "Macerocym" und "Cellulase Onozuka" auch in den Versuchen der vorliegenden Arbeit verwendet worden sind.

Der zellwandabbauende Prozeß kann in zwei Phasen verlaufen, die modellartig von TAKEE et al. (1968) bei der Isolierung von Protoplasten aus Tabakblättern beschrieben worden sind: Zunächst trennt er die Zellen mit Hilfe von "Macerocym" und anschließend behandelt er die Einzelzellen mit Cellulase Onozuka, wodurch die Wände vollständig entfernt und die Protoplasten freigesetzt werden. Leider ist dies nicht mit jedem Gewebe zu erreichen, oft gehen beide Vorgänge ineinander über, wie z.B. bei der Isolierung von Protoplasten aus Getreide (EVANS et al. 1972). POWER und COCKING (1970) empfehlen beide Enzympräparate gleichzeitig anzuwenden. In den eigenen Versuchen hat sich sogar herausgestellt, daß für die Isolierung von Protoplasten aus Kalluskulturen von *Daucus carota* Cellulase Onozuka allein genügt. Aus dem alten Kallusstamm lassen sich zu 100% Protoplasten gewinnen, aus jungen Kalluszellen lassen sich zu 60% Protoplasten gewinnen.

Daraus läßt sich schließen, daß die Zellen des alten Kallusstammes in ihrer Wandzusammensetzung weitgehend gleich sein müssen, während junge Kulturen Zellen mit unterschiedlichem Wandaufbau besitzen. Über den genauen Zellwandaufbau gibt es bisher nur wenig Vorstellungen, zwar sind viele Bausteine der Zellwand vor allem durch gaschromatographische Analysen bekannt geworden, doch kann das molekulare strukturelle Bild der Zellwand noch nicht voll rekonstruiert werden (NEVINS et al. 1964). ALBERSHEIM hat daher 1972 auf dem Ersten Internationalen Protoplastensymposium auf die Möglichkeit hingewiesen, daß die Isolierung von Protoplasten zur Klärung der Zellwandprobleme beitragen könnte. Da Suspensionskulturen größtenteils nur eine Primär-

wand besitzen, könnten durch hochgereinigte und damit substratspezifische Enzyme die einzelnen Bausteine sukzessiv abgebaut und so ihre Verknüpfung aufgedeckt werden.

Cellulose ist bisher als einziger Baustein einer typischen Primärwand in Form einer linearen Kette von β -1,4-gebundenen Glucosemolekülen genau definiert. Alle anderen wandaufbauenden Polymere, wie Hemicellulosen, Pektine, Proteine und Lipide müssen dagegen in ihrem quantitativen Aufbau und in der Art ihrer Verknüpfung erst noch näher erforscht werden. Erschwerend wirkt sich dabei die Tatsache aus, daß die relative Zusammensetzung der Wand nach Herkunft und Alter der Zellen große Unterschiede aufweist.

Bei Untersuchungen von Gewebekulturen haben GRANT und FULLER (1968) gefunden, daß Kalli mit größeren Zellaggregaten mehr Zellwandpolysaccharide enthalten als lockere Kalli, und daß sie im Verhältnis mehr pektinartige Substanzen und Hemicellulosen als Cellulose haben.

Da in jungen Kalluskulturen besonders viele Zellaggregate sind, könnte das auch erklären, wieso bei Zusatz von Macerocym die Protoplastenausbeute gesteigert werden konnte.

Im Zusammenhang mit dem Zellwandaufbau ist es auch zu verstehen, warum Zellen der frühen Wachstumsphase bevorzugt zur Protoplastenisolierung genommen werden (SCHENK und HILDEBRANDT 1969, PEARCE et al. 1972, da sie HRICOVÁ et al. 1974) hauptsächlich noch dünne Zellwände besitzen. ERIKSSON et al. (1969), WALLIN et al. (1972) verwenden Kallusmaterial, daß jeden Tag bzw. jeden 2.-3. Tag in frisches Medium übertragen wird, und erhalten z.B. 80-100% Protoplasten aus *Haplopappus gracilis* Suspensionzellen; sie meinen, daß besonders schnell wachsende Gewebekulturen relativ homogene und leicht zu spaltende Zellwände haben.

Der Zellwandabbau hängt nicht nur vom Alter der Kultur ab, sondern wird durch bestimmte Kulturbedingungen beeinflusst. Es zeigt sich nämlich, daß auch der alte Kallus Zellen besitzt, deren Zellwände sich mit Cellulase nicht hydrolysieren lassen, wenn er nicht auf dem Medium M_S , sondern M_W oder auf M_S im Licht kultiviert wird. Damit ist zu den bereits in den Arbeiten von REINERT et al. (1970) und MEYER-TEUTER und REINERT (1973) aufgezeigten Unterschieden von M_S - und M_W -Kulturen von *Daucus carota*, ein weiterer noch näher zu untersuchender Unterschied im Zellwandaufbau hinzuzufügen. (Die Zellzusammensetzung der M_S -Licht bzw. M_W -Dunkel-Kulturen des alten Kallusstammes ähnelt im äußeren Erscheinungsbild dem jungen Kalluszellen.)

Um Protoplasten auch aus diesen Zellen freizusetzen, bedarf es gegebenenfalls weiterer Enzympräparate. Zur Zeit werden hauptsächlich vier Cellulase- und drei Pektinasepräparate verwendet. Wahrscheinlich lassen sich auf Grund ihrer abweichenden Zusammensetzung und ihres Reinheitsgrades gewisse Unterschiede in den Resultaten der einzelnen Laboratorien hinsichtlich der Konzentration und Inkubationszeit aber auch Ausbeute und Vitalität der gewonnenen Protoplasten erklären.

Cellulasen werden aus Pilzen oder Schnecken gewonnen, von denen sich *Trichoderma viride* als besonders gute Enzymquelle erwiesen hat. Die "Cellulase Onozuka" aus diesem Pilz, die auch in dieser Arbeit verwendet wird, ist wohl das bekannteste Enzym zur Zellwandbeseitigung überhaupt (TAKEBE et al. 1968, ERIKSSON et al. 1969, SELBY 1972 u.a.). In einigen Fällen wie z.B. bei *Taraxacum*-Blättern (PINTO DA SILVA 1969, und Zuckerrohr (MARETZKI und NICKELL 1972) und Barley aleuron (TAIZ et al. 1971) führt erst die Behandlung mit dem Schneckenenzym "Glusulase" zur erfolgreichen Isolierung von Protoplasten. Daneben befinden sich seit neuerer Zeit im Handel auch "Driselase", extrahiert aus einem Basidiomyceten (Firma: Kyowa Hakko Kogyo, Tokyo), deren Qualität von GAMBORG et al. (1973) als zufriedenstellend bezeichnet worden ist, und die in zunehmenden Maße die Cellulase Onozuka verdrängt, da bei vielen Geweben dann zusätzlich auf Pektinasen verzichtet werden kann (WALLIN et al. (1974), GLIMELIUS et al. 1974, KAO et al. 1974 u.a.) und "Meicelase" (Firma: Meije Seika Kaisha Ltd., 2-Chom, Kyobshi Chuo-ku, Tokyo), die von EVANS und COCKING (1972), WAITTS et al. (1974) u.a. benutzt wird.

Über die Cellulase Onozuka und Meicelase sind einige Daten bekannt: beide Präparationen enthalten Cellulase C₁ (die native und crystalline Cellulose angreift), Cellulase C_x (die amorphe Cellulase abbaut), ferner Cellobiase, Xylanase, Glucanase, Pektinase, Lipase, Phospholipase, Nuklease und einige andere Enzyme mycolytischer Art, wie β -1,3-Glucanase und Chitinase (COCKING 1972). Dadurch wird es verständlich, daß in einigen Fällen wie z.B. bei alten Kalluszellen ein einziges Enzympräparat ein so komplexes Gebilde wie die Zellwand abzubauen vermag. Größtenteils ist es aber angebracht, die Wirkung der Cellulasen durch Pektinasepräparate zu unterstützen. Dazu gehören das "Pectinol R 10" (von Röhm und Haas) (GREGORY et al. 1965, BOULWARE et al. 1972 u.a.), die "Pectinase" (von Sigma) (KAMEYA et al 1972, PELCHER et al. 1973 u.a.), und das auch in dieser Arbeit verwendete "Macerocym"

(TAKEBE et al. 1968, ITO 1973 u.a.). Alle drei Präparate zeichnen sich durch hohe Polygalacturonaseaktivität aus. (Solche Pektinasen eignen sich besonders gut zur Isolierung von Protoplasten aus Früchten (COCKING 1960, RAJ und HERR 1969). Das Macerocym enthält keine mycolytischen Enzymkomponenten (COCKING 1972) und obwohl es auch nur wenig cellolytische Enzymaktivität besitzt, ist es möglich, aus jungen Kal-luszellen von *Daucus carota* bereits nur mit diesem Enzym Protoplasten zu isolieren.

Einer der kritischsten Faktoren bei der Behandlung der Gewebe mit die-sen Enzymen ist ihr sehr unterschiedlicher Reinheitsgrad. Alle diese Präparate enthalten neben den dem Zellwandabbau förderlichen, auch viele für die Vitalität der Protoplasten schädliche Komponenten (SCHENK und HILDEBRANDT 1969). Diese Substanzen können andere Enzyme, wie verschiedene Nukleasen, Ribonukleasen, Proteinasen, Lipasen und Peroxidasen, aber auch nicht enzymatische Stoffe in toxischer Kon-zentration sein (POJNAR et al. 1967, PILET 1971, RUESINK 1971, COCKING 1972 u.a.).

Daher sollten zum Vergleich mechanisch isolierte Protoplasten unter-sucht werden (BINDING 1966, PILET, PRAT und ROLAND 1972).

In verschiedenen Laboratorien werden vor Anwendung der Enzyme bestimmte Reinigungsschritte vorgeschaltet, indem z.B. diese Präparate über ein Biogel P4 oder Sephadex G-25 entsalzt (KAO, KELLER und MILLER 1970 u.a.) oder mit Aktivkohle versetzt werden (ERIKSSON et al 1974). Inwieweit dadurch schädigende Bestandteile der Enzympräparate beseitigt werden, ist noch nicht eindeutig bewiesen. Erreicht wird damit jedenfalls eine starke Erhöhung der Aktivität der Enzympräparate, wodurch deren Konzen-tration herabgesetzt, oder die Inkubationszeit verkürzt werden kann.

Für die Isolierung von Protoplasten aus Crown-gall-Kallus von Parthe-nocissus benötigen COCKING und EVANS (1973) 24 Stunden, mit einer ent-salzten Enzympräparation nur vier Stunden.

Bei etwa gleich langer Inkubationszeit von 10-15 h verwenden KAMEYA und UCHIMIYA (1972) 0,1% Pektinase und 5% Cellulase, GRAMBOW et al. (1972) dagegen nur 0,25% Hemicellulase und 0,5% entsalzte Cellulase zur Frei-setzung von Protoplasten aus *Daucus carota* Zellen. Versuche der hiesi-gen Laboratorien zeigen, daß sich Protoplasten aus Karottenkallus nur mit Cellulase isolieren lassen, in einer Konzentration von 5% (HELLMANN und REINERT 1971), mit entsalztem Enzym 1,5% (GOSCH, BAJAJ und REINERT 1975).

Die Frage der Vitalitätsbeeinträchtigung durch Enzympräparate bleibt aber noch zu klären, NAGATA und TAKEBE (1970), POWER und COCKING (1970), CHUPEAU und MOREL (1970) halten ein Entsalzen für ^{nicht} erforderlich, zumal dadurch auch unerwünschte Enzyme aktiviert werden könnten.

Die Aktivität der Enzympräparate wird schließlich auch von pH-Wert und der Temperatur deutlich beeinflusst. Hier gilt es, Bedingungen zu wählen, die die Wandhydrolyse fördern ohne die Zellen zu schädigen. Im allgemeinen liegen die Angaben für den pH-Wert mit kleinen Abstufungen zwischen 5,0 und 6,0 (COCKING 1960, TAKEBE et al. 1968, HILDEGRAND und SCHENK 1969, ERIKSSON et al. 1969, KAO et al. 1970, PELCHER et al. 1973, UCHIMIYA et al. 1974). Eine optimale Isolierung wird auch in dieser Arbeit bei pH 5 erreicht.

Für den Temperaturbereich dagegen variieren die Angaben in der Literatur erheblich, da indiesem Zusammenhang die Inkubationszeit mit eine Rolle spielt, andererseits aber auch die Gewebe bzw. Zellen sehr unterschiedliche Temperaturempfindlichkeit besitzen. Protoplasten können z.B. aus Kalluszellen von *Zea mays* bei 37°C in 3,5 h gewonnen werden (MOTOYOSHI 1971) aus Tabakmesophyllzellen bei 21°C in 4 h (TAKEBE et al. 1968). In der eigenen Arbeit läßt sich ähnlich den Ergebnissen von BINDING (1974) ein schädigender Effekt (Braunwerden der Protoplasten) durch höhere Temperaturen feststellen, insbesondere an Zellen, die sich über sechs Jahre an Temperaturen von 28 bzw. 18°C gewöhnt haben, sodaß darauf verzichtet worden ist, den Isolierungsprozeß durch Temperaturerhöhung zu beschleunigen.

Als wesentlich für eine optimale Isolierung ist das Verhältnis von Gewebemenge zu Volumen der Enzymlösung. Das Resultat dieser Arbeit liegt bei 100 mg Kallus pro 10 ml Isolierungsmedium. KAMEYA (1973) nimmt 1g auf 10 ml, GRAMBOW et al. (1972) 100 mg auf 4ml, OHYAMA et al (1972) 3g auf 20ml. Da weder Zellzahl, noch Zellart, noch die Konzentration des Enzyms eindeutig berücksichtigt werden können, und außerdem auch andere Bedingungen wie Reaktionsraum und Schüttelgeschwindigkeit unbekannt sind, kann kein Vergleich gezogen werden, doch zeigt sich daran gut, daß der Isolierungsprozeß noch von anderen Faktoren, wie z.B. natürlichen Inhibitoren, die einige Pflanzen selbst besitzen (MANDEL und REESE 1965) abhängt. Möglicherweise kann auch die Cellulaseaktivität durch das Endprodukt Cellobiose gehemmt werden (REESE 1956).

Ein weiteres Problem ergibt sich durch Zusätze zum Isolierungsmedium. So können Salzen, d.h. bestimmten Ionen Ca^{++} z.B. (COUTTS 1973) neben Saccharose (COCKING 1972) zwar ebenfalls die Cellulaseaktivität beeinträchtigen, doch wirken sie sich positiv auf den Zustand der Protoplasten aus. Daher werden zur Erhöhung der Rate lebensfähiger Protoplasten entweder bestimmte Pufferlösungen (WALLIN et al. 1973, SCHIEDER 1974 u.a.), oder Agenzien wie Dextransulfat (AOKI et al. 1969, BINDING 1974 u.a.) oder vollständige Nährmedien, wie auch in den eigenen Versuchen, der Isolierungslösung hinzugefügt (BAWA et al. 1971, CONSTABLE et al. 1973, FOWKE et al. 1974 u.a.)

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Problematik bei der Isolierung von Protoplasten in der gleichzeitigen Forderung liegt, die Zellwände vollständig zu beseitigen, ohne die Zellen in ihrer Vitalität zu beeinträchtigen. Die erste Forderung hinsichtlich der Wandauflösung läßt sich mit Hilfe bestimmter Enzyme weitgehend erfüllen. Die Wirksamkeit und Aktivität des jeweiligen Enzympräparates hängt dabei von der Enzymkombination, vom Reinheitsgrad, von der Konzentration, sowie von bestimmten Effektoren bzw. Inhibitoren ab, und kann durch die Wahl des pH-Wertes, der richtigen Temperatur und Inkubationszeit optimiert werden.

Die zweite Forderung hinsichtlich der Vitalität der Protoplasten läßt sich nur im beschränkten Maße verwirklichen, denn erstens sind Nebenwirkungen des Enzympräparates nicht auszuschließen, und zweitens ist die Plasmolyse nicht zu umgehen, deren Auswirkungen weiter unten ausführlich diskutiert werden.

Nach der Isolierung müssen die Protoplasten gereinigt werden, bevor sie kultiviert werden können, d.h. das Isolierungsenzym muß beseitigt bzw. ausgewaschen werden, und die intakten Protoplasten von Zellen, Zellresten sowie sonst geschädigtem und totem Material getrennt werden. Ein großes Problem ist dabei, daß Protoplasten neben osmotischen Veränderungen des Mediums auch mechanischen Einflüssen gegenüber sehr empfindlich sind. Insbesondere stark vakuolisierte Protoplasten bersten bereits bei geringen Erschütterungen (GREGORY et al. 1966, RUESINK 1971).

So können Protoplasten aus dem alten Kallusstamm von *Daucus carota* nicht zentrifugiert werden. Die Beseitigung des Enzyms ist daher auf dem Wege der Verdünnung vorgenommen worden.

Vorteilhafterweise erübrigen sich weitere Reinigungsschritte, da aus dem alten Kallusmaterial 100% Protoplasten gewonnen werden können, die auf Grund des ausgezeichneten Zustandes der Zellen eine saubere Suspension ergeben.

Protoplasten aus jungem Kallus müssen hingegen von Zellen, deren Zellwände sich nicht aufgelöst haben, sowie Zellresten gereinigt werden.

RUESINK (1971) hat einen Protoplastenverlust von bis zu 50% während solcher Reinigung errechnet. Auch COCKING und EVANS (1974) betonen, wie schwierig es ist, Protoplasten von den übrigen Bestandteilen zu trennen. Bei Untersuchungen von GREGORY et al. (1965) über die mechanische und osmotische Stabilität von Protoplasten und Vakuolen hat sich Magnesium als wesentlicher Faktor zur Stabilisierung von Membranen erwiesen. Calcium hat einen ähnlichen Effekt. RUESINK und THIMANN (1966) setzen daher dem Medium Calcium zu, wenn sie Protoplasten zentrifugieren. Die Zentrifugation muß allerdings bei sehr niedriger g-Zahl erfolgen. Während HORINE et al. (1972) 50xg nicht überschreiten, GLEBA et al (1974) 70xg einsetzt, zentrifugieren die meisten bei 100xg (AOKI et al 1969, BLASCHEK et al. 1974, KAO et al. 1974, WATTS et al. 1974), TAIZ et al. (1971) erhalten noch bei 250xg, PERCE et al. (1972) bei 300xg und KANAI et al. (1973) bei 400xg intakte Protoplasten.

Protoplasten aus jungem Karottenkallus werden bei maximal 100xg zentrifugiert, da bei höheren g-Zahlen der Verlust zu groß wird.

Vor dem Zentrifugieren hat es sich als zweckmäßig erwiesen, die Protoplastenpräparation zu filtrieren, um sie von größeren Zellaggregaten und Geweberesten zu befreien. Dazu werden z.B. Stahlgitter oder Gaze unterschiedlicher Porenweite benutzt (53 μ von KAMEYA et. al. 1973, 61 μ von HANKE et al. 1974, 80 μ von KAO et al. 1974, 100 μ von BINDING 1974). Da die Zellaggregate des Karottenkallus sehr klein sind, muß Nylongaze mit einer Maschenweite von nur 30 μ verwendet werden.

Während Protoplasten aus Blättern nach kurzem Zentrifugieren in 25%iger Saccharoselösung an die Oberfläche schwimmen und bequem abpipettiert werden können (EVANS et al. 1972, POWER et al. 1974, u.a.), hat sich in vielen Fällen, so auch bei Karottenprotoplasten gezeigt, daß eine einfache Zentrifugation nicht ausreicht, um eine halbwegs quantitative und saubere Protoplastenfraktion zu gewinnen, da ein großer Anteil Protoplasten mit den Zellresten im Sediment zurückbleibt.

CHUPEAU und MOREL (1970) haben mit Hilfe eines Stufengradienten aus Saccharose und Sorbit die Trennung von Protoplasten und Zelltrümmern verbessert. In etwas abgewandelter Form ist dieses Verfahren auch in der vorliegenden Arbeit angewendet worden.

Inzwischen ist ein wässriges Zwei-Phasensystem bestehend aus Dextran, Polyäthylenglycol, Sorbit und Salzen von KANAI et al. (1973) ausgearbeitet worden, dem wohl bei weitem der Vorzug zu geben ist, da es zu einer sehr sauberen Auftrennung führt.

Zahlreiche entwicklungsphysiologische, genetische aber auch biochemische Untersuchungen erfordern eine mehr oder weniger lange Kultivierung der Protoplasten. Dabei stellen Protoplasten unter anderem auf Grund ihrer Empfindlichkeit besondere Ansprüche an die Kulturbedingungen, sodaß in dieser Hinsicht noch viele Probleme zu lösen sind (ERIKSSON et al. 1974)

Erfahrungen, die auf dem Gebiet der Gewebekultur erworben worden sind, erweisen sich dabei für die Kultivierung von Protoplasten von großem Nutzen. Dies gilt nicht nur für Protoplasten als Kalluskulturen, sondern auch für Protoplasten, die direkt aus dem Gewebeverband intakter Pflanzen isoliert worden sind, wie z.B. aus Blättern (NAGATA et al. 1970, 1971, NITSCH und OHYAMA 1971, DURAND et al. 1973, MEYER et al. 1975 u.a.).

Wohl eine der wichtigsten Erfahrungen betrifft die sterile Handhabung des Pflanzenmaterials, wie sie bei Gewebekulturen üblich ist, und die als notwendige Voraussetzung für längerfristige Untersuchungen angesehen werden muß.

Trotz erfolgreicher Anwendung von Antibiotika zur Verhinderung von Infektionen bei der Protoplastenkultur (HEß et al. 1972: Chloramphenicol, WATTS et al. 1974: Carbenicillin EVANS et al. 1972: Gentamycin u.a.) sollte der aseptischen Technik der Vorzug gegeben werden, da mit dieser von vornherein unbekannte Einflüsse vermieden werden.

Da Karottenprotoplasten aus in vitro kultivierten Pflanzen und Kalluskulturen isoliert werden können, tritt dieses Problem nicht neu auf. Die Kultivierung wird unter Beachtung der üblichen Vorsichtsmaßnahmen vorgenommen.

Die Art der Kultivierung der Protoplasten hängt weitgehend von der Fragestellung des Experimentes ab, so besteht die Möglichkeit, Protoplasten als Suspensions- oder Agarkultur, d.h. in flüssigem oder auf festem

Nährmedium zu kultivieren (NAGATA et al. 1970, 1971, KAO et al. 1970, HELLMANN und REINERT 1971, GRAMBOW et al. 1972, WALLIN et al. 1973 u.a.).

Bei einer Flüssigkultur ist der Gasaustausch besser, die Diffusion von Ausscheidungsprodukten schneller, sowie der Wechsel des Mediums leichter (GAMBORG et al. 1972). Die Plattenkultur bietet dagegen den Vorteil, die fortlaufende Entwicklung einzelner Protoplasten festzuhalten und ist zur Sektion von Klonkulturen hervorragend geeignet (NAGATA et al. 1971).

In der vorliegenden Arbeit hat sich zur Beobachtung individueller Protoplasten eine von REINERT et al. (1964) abgewandelte Plattentechnik nach BERGMANN (1960) am geeignetsten erwiesen, für Versuche mit Stichprobenentnahme die Flüssigkultur. Dabei werden die Protoplasten wegen ihrer Empfindlichkeit in einem dünnen Flüssigkeitsfilm auf nur 0,4%tigen Agarboden übertragen. Bei der Flüssigkultur muß auf ein Schütteln verzichtet werden.

Ähnliche Kulturmethoden für Protoplasten werden auch andere Laboratorien angewendet. KAO et al. (1970, 1971), GRAMBOW et al. (1972), PEICHER et al. (1974) u.a. kultivieren Protoplasten in einem Tropfen Medium von 50 μ l bis maximal 200 μ l in kleinen Petrischalen, VASIL et al. (1973) verwenden Mikrokammern, SCHENK und HILDEBRANDT (1970) haben eine bestimmte Kapillarmethode entwickelt, NAGATA und TAKEBE (1970), WALLIN und ERIKSSON (1973) u.a. betten die Protoplasten in dünne Agarplatten ein.

Unabhängig vom Nährmedium, sowie anderen Kulturbedingungen wie z.B. Temperatur und Licht kann die Art der Kultivierung im flüssigen oder auf festen Milieu als physikalischer Faktor das Verhalten der Protoplasten beeinflussen. Neben Auswirkungen auf die Regenerationsfähigkeit (s.u.) zeigt sich ein schnell sichtbarer Effekt in der Formbildung. Während Protoplasten aus dem alten Kallus von *Daucus carota* in Flüssigkultur sphärisch bleiben, verformen sie sich auf Agar stark, bilden "gewebeartige Flächen" und aggregieren zunehmend (HELLMANN und REINERT 1971, DAVEY et al. 1972, BRIGHT et al. 1974). Buddingerscheinung oder Subprotoplastenbildung auf Agarmedium führt in Flüssigkultur zum schnelleren Zerfall in Teilprotoplasten und Loslösung der Einheiten vom Stammprotoplasten. Ähnliche Beobachtungen haben auch COCKING et al. 1970, BAWA und TORREY 1971, VASIL et al. 1973, BOGERS 1973, RAJ und HERR 1973, HORINE und RUESINK 1972, GOSCH, BAJAJ und REINERT 1975 u.a. beschrieben. Möglicherweise lassen sich diese Phänomene auf eine star-

ke Oberflächenveränderung der Protoplasten, sowie unterschiedlichen Stoffaustausch in festem gegenüber flüssigem Medium zurückführen.

Die Effizienz der Kultivierung hängt von der Sauerstoffzufuhr (KAO et al. 1974 u.a.) der Anzahl Protoplasten pro Volumeneinheit und schließlich auch von der Zusammensetzung des Nährmediums ab.

In den Arbeiten mit Zellkulturen hat sich bereits gezeigt, daß bestimmte Relationen zwischen Pflanzenmaterial und Menge des Kulturmediums eingehalten werden müssen (REINERT et al. 1964, VASIL et al. 1964 u.a.).

Das Ergebnis dieser Arbeit liegt für eine optimale Kultur bei einem Protoplastentiter von 10^5 / ml und stimmt damit gut mit den Angaben in der Literatur überein. So arbeiten z.B. KAMEYA et al. (1972) mit einer Protoplastendichte von 10^5 - 10^6 /ml, MOTOYOSHI (1971) mit 2×10^5 /ml, WALLIN et al. (1973) mit 10^5 /ml, UCHIMIYA et al. (1974) mit 10^5 - 10^6 /ml, NAGATA und TAKEBE (1971) mit 5 - $7,5 \times 10^3$ /ml in Agar- und mit 1 - $1,5 \times 10,4$ /ml in Flüssigmedium.

Wahrscheinlich handelt es sich auch hier um einen "Konditionierungseffekt", wie er bereits für Einzelzellkulturen beschrieben worden ist (REINERT und v. ARDENNE 1964, EARLE und TORREY 1965 a).

Allerdings haben NAGATA und TAKEBE (1971) beim Vergleich von Protoplasten mit Einzelzellen festgestellt, daß Protoplasten bis zu 45 % besser wachsen als Zellen. Dies stimmt gut mit den eigenen Ergebnissen überein, denn auch hier erwiesen sich Protoplasten lebensfähiger als plasmolysierte Zellen.

Im Vergleich zu plasmolysierten Zellen nehmen Protoplasten die vierfache Menge an Leucin auf RUESINK (1973). Offensichtlich hat die Zellwand bei der Stoffaufnahme und -abgabe eine weitaus größere Funktion als bisher angenommen worden ist. Diese Annahme läßt sich durch Vitalfärbungsversuche mit Neutralrot unterstützen. Neutralrot wird im Bereich um pH 7 von der Wand durchgelassen und dringt in die Vakuole ein, bei pH 5 wird es dagegen von der Wand festgehalten. Protoplasten akkumulieren sowohl bei pH 7 als auch bei pH 5 Neutralrot in der Vakuole. Neben dem Lipophiliegrad ist hierfür vor allem der Ladungszustand der Wand verantwortlich.

Der Vergleich von Zellen mit Protoplasten könnte ein gutes System sein, ungeklärte Wandfunktionen zu untersuchen. Einige Bestrebungen werden in dieser Richtung unternommen, u.a. zur Klärung der Lokalisierung der Peroxidase-Isoenzyme (MÄDER, MEYER und BOPP (1975) u.a.).

Im Hinblick auf den "Konditionierungseffekt" sind jedoch noch einige Punkte zu diskutieren. STUART und STREET (1969) können die Zelldichte herabsetzen, wenn sie Kulturmedien, die durch vorheriges Wachstum von Zellen konditioniert worden sind, verwenden. Auf solchen kond. Nährmedien haben zunächst KAO et al. (1970) MARETZKI et al. (1973) u.a. kultiviert. Erst durch Erhöhung der Protoplastenzahl pro ml hat KAO et al. (1971) später auf konditionierte Medium verzichten können. Bei der Kultivierung von Protoplasten aus alten Kalluskulturen von *Daucus carota* auf konditioniertem Medium läßt sich zwar ein stärkeres Aggregieren der Protoplasten feststellen, doch überleben insgesamt weniger Protoplasten als im synthetischen M_S - Medium. Da diese Versuche mit optimaler Protoplastendichte durchgeführt worden sind, kommt es wahrscheinlich zu einem schädigenden Überangebot an "Konditionierungsfaktoren". Vermutlich handelt es sich dabei um besondere Enzyme, Polysaccharide und Wachstumsstoffe, die an das Medium abgegeben werden (EARLE und TORREY 1965 a, MACKENZIE und STREET 1970 u.a.).

Die Ansprüche der Protoplasten an das Kulturmedium sind sehr unterschiedlich, je nachdem aus welcher Pflanze bzw. aus welchem Gewebe- oder Zelltyp sie isoliert worden sind, sodaß die Auffindung optimaler Medien weiterhin ein vorrangiges Bestreben bleiben wird (GAMBORG et al. 1973, ERIKSSON et al. 1974). In manchen Laboratorien wird dem Medium Kokosnußmilch (KAMEYA et al. 192), oder Hefeextrakt (MOTOYOSHI 1971, HORINE et al. 1972, ITO 1973) Caseinhydrolysat (PELCHER et al. 1974) oder "Reibsaft" (POTRYKUS et al. 1972) zugesetzt.

Da diese Zusätze zahlreiche noch nicht identifizierte Substanzen enthalten, sind halbsynthetischen Medien vollsynthetisches immer vorzuziehen.

In den eigenen Versuchen sind Karottenprotoplasten daher auf dem Medium M_S (REINERT et al. 1966) mit entsprechendem Plasmolytikum kultiviert worden. Die Protoplasten bleiben über ein Jahr am Leben, und solche aus jungen Gewebekulturen regenerieren zu kleinen Kalluskolonien. In weiterführenden Untersuchungen kommt es darüberhinaus zu einer Embryobildung (GOSCH, BAJAJ und REINERT 1975). Entsprechende Ergebnisse liegen auch von GRAMBOW et al. (1972) und WALLIN et al. (1973) vor. Beide verwenden ebenfalls vollsynthetische Medien, erstere das B5 Medium nach GAMBORG et al. (1968), letztere ein von ERIKSSON (1965) modifiziertes Murashige-Skoog-Medium.

Der Grundnährstoffbedarf der Protoplasten entspricht also im wesentlichen demjenigen der in vitro kultivierten Zellen. Bei der Protoplastenkultur erweist es sich von Vorteil, dasjenige Medium beizubehalten, an das sich die Kalluszellen gewöhnt haben (KAO et al. 1971, WALLIN et al. 1973). In den eigenen Versuchen ist es sogar notwendig gewesen, denn weder Protoplasten noch Suspensionszellen des alten Kallusstammes von *Daucus carota* haben sich auf dem "NAGATA-TAKEBE-Medium" (1971) M_5 kultivieren lassen. Offensichtlich ist während der sechsjährigen Kulturzeit eine starke Adaptation an das Medium eingetreten, wodurch die Umstellung auf eine andere Nährstoffzusammensetzung nicht mehr so ohne weiteres möglich ist. Die Gewöhnung an bestimmte Nährmedien wird auch von MEYER-TEUTER (1972) hervorgehoben und für ein undifferenziertes Kalluswachstum älterer Kulturen verantwortlich gemacht. Entsprechende Erfahrungen haben auch MARETZKI und NICKELL (1973) gemacht: Zuckerrohrprotoplasten lassen sich weit besser auf dem eigenen Standardmedium als auf anderen Medien kultivieren.

Für Protoplasten, die frisch aus dem Gewebe intakter Pflanzen isoliert werden sollen, aus denen bisher noch keine Gewebekulturen gewonnen werden, müssen gegebenenfalls neue Medien zusammengestellt werden. Für die Kultivierung von Protoplasten aus Tabakmesophyllzellen hat sich das Nährmedium von NAGATA und TAKEBE (1971) als besonders erfolgreich erwiesen (SCHILDE-RENTSCHER 1973, VASIL et al. 1973, DONN et al. 1973, WATTS et al. 1974, GLEBA et al. 1974 u.a.). Protoplasten aus Petunien erfordern wiederum ein anderes Medium (DURAND et al. (1973), FREARSON et al. 1973, DAVEY et al. 1973, BINDING (1974). Die Reihe der Kulturmedien für Protoplasten kann mit dem von NITSCH und OMYAMA (1971) entwickelten Medium, das auch EVANS et al. (1973) und HESS et al. (1972) benutzen, mit dem modifizierten HELLER-Medium (PRAT 1973, CHUPEAU et al. 1970 u.a.) und vielen anderen Medien fortgesetzt werden und zeigt wie unterschiedlich die Nährstoffansprüche von Protoplasten sein können.

Ein Vergleich der Zusammensetzung der Medien würde zu weit führen, doch sollen die kritischen Komponenten genannt werden. Neben einigen besonders in letzter Zeit beachteten Ionen, wie Ca^{++} und Mg^{++} , (SCHENK et al. 1970, KAO et al. 1973, WALLIN et al. 1973, BINDING 1974 sind es insbesondere die Wuchsstoffe (GREGORY et al. 1966, DONN et al. 1973, DAVEY et al. 1973, BUI-DANG-HA 1974, WATTS et al. 1974, VASIL et al. 1974, MESSERSCHMIDT 1974 u.a.) und speziell die für Protoplasten notwendigen

Plasmolytika (RUESINK 1973, WALLIN et al. 1973, ERIKSSON et al. 1974 u.a.). Die Wirkung der Ionen ist sehr komplex, sie können z.B. bei Enzymaktivierung aber auch für den Zustand der Membran von Bedeutung sein. Die Phytohormone werden für Permeabilitätsänderungen und vor allem für die Regenerationsfähigkeit verantwortlich gemacht. Der Einfluß der Plasmolytika auf die Protoplasten ist kaum weniger gravierend und sollte nicht nur unter dem Aspekt der Stabilisierung gesehen werden. Deshalb ist diesem Faktor in der vorliegenden Arbeit ein Teil der Versuche gewidmet (s.u.). Ähnlich den Ergebnissen von WALLIN et al. (1973) ist durch hohe osmotische Werte des Mediums eine eindeutig hemmende Wirkung auf Wachstum und Entwicklung der Protoplasten und Zellen festgestellt worden.

An dieser Stelle ist es angebracht, auf die Frage einzugehen, was überhaupt unter einer erfolgreichen Kultivierung verstanden wird. Weitgehend wird der Standpunkt vertreten, es gehöre hierzu, daß die Protoplasten Zellwände regenerieren, sich teilen, Kallus zu bilden und sich daraus ganze Pflanzen entwickeln. Sicherlich ist dies für zahlreiche Probleme, notwendig, andererseits sind aber alle Entwicklungsschritte, die aus wandlosen Protoplasten wieder zellwandbesitzende Zellen machen, unerwünscht, wenn es darum geht, langfristige Experimente ohne Interaktion der Zellwand durchzuführen, wie z.B. bei Untersuchungen von Membraneigenschaften.

Ideal wäre es, wenn durch die Kulturbedingungen, die einzelnen Phasen der Entwicklung der Protoplasten schrittweise unter Kontrolle gebracht werden könnten, um zu einem beliebigen Zeitpunkt, die Regeneration einzuleiten.

Vielversprechend in dieser Hinsicht schien die Arbeit von TAKEBE, LABIB und MELCHERS (1971) zu sein, die als erste über die Regeneration einer ganzen Pflanze aus Protoplasten durch dreimaligen Mediumwechsel berichtet haben. Zunächst kultivieren sie die Protoplasten aus *Nicotiana tabacum* auf einem modifiziertem Medium nach Kohlenbach unter Zusatz von Kokosnußmilch bis zur Kallusbildung, dann überführen sie diese auf das synthetische Medium B3 nach Sacristan und Melchers zur Regeneration von Sprossen und schließlich übertragen sie diese Protoplasten zur Wurzelinduktion und Bildung einer ganzen Pflanze auf das Medium ohne Auxin und Kinetin. Einen Wechsel der Medien nimmt auch MESSERSCHMIDT (1974) bei der Kultur von Protoplasten aus *Pharbitis nil*. vor; bis zur Kallusbildung bleiben die Protoplasten auf dem Medium nach DURAND et al. (1973), danach werden sie zur Differenzierung auf das NAGATA-TAKEBE-Medium (1971) überführt.

Eine genauere Analyse dieser Methoden ist aber in gewisser Weise enttäuschend, da die Steuerbarkeit der Entwicklung des Protoplasten zur Pflanze erst nach der Zellwandbildung beginnt, und somit den Erfahrungen auf dem Gebiet der Organogenese entspricht, wonach es möglich ist, durch bestimmte Medien undifferenziertes Kalluswachstum zu erhalten, durch andere Medien dagegen Wurzel- oder Sproßbildung zu erzeugen oder aber Embryonen zu induzieren (REINERT 1973).

Die Erfolge der letzten Jahre bei der Gewinnung einer ganzen Pflanze aus Protoplasten dürften daher auf die Methodik der Gewebekulturen zurückzuführen sein (DONN et al. 1973, BUIDANG-HA et al. 1973, KARTHA et al. 1974). So gelingt es auch bereits auf ein und demselben Medium diesen Entwicklungsprozeß zu verfolgen wie z.B. bei *Daucus* (GRAMBOW et al. 1972, GOSCH, BAJAJ und REINERT 1975).

Doch fehlt bis jetzt noch ein Medium, das ausschließlich die Vitalität und Stabilität der Protoplasten erhält, dabei aber eine erneute Wandbildung verhindert.

Wenn auch nicht durch das Medium, so doch auf Grund bestimmten Pflanzenmaterials ist es möglich, den Protoplastenzustand über längere Zeit zu erhalten, wie es mit Protoplasten aus dem alten Kallusstamm von *Daucus carota* gezeigt worden ist. Mit diesem Ergebnis kann eine in dieser Art noch nicht beschriebene Protoplastenkultur vorgestellt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sind die Lebens-, Fusions-, Regenerations- und Teilungsfähigkeit der Protoplasten aus Kalluskulturen von *Daucus carota* untersucht worden. Dabei hat sich gezeigt, daß die Protoplasten aus dem alten Kallusstamm völlig andere Eigenschaften haben als die Protoplasten aus jungen Kalluskulturen.

So aggregieren oder fusionieren Protoplasten aus dem alten Kallusstamm nicht, bilden keine Zellwände, zeigen Kern- aber keine Zellteilungen und nehmen erheblich an Größe zu.

Protoplasten aus jungen Kalluskulturen fusionieren spontan, regenerieren neue Zellwände, teilen sich und entsprechen damit wieder Kalluszellen.

Um diese sehr unterschiedlichen Ergebnisse zu verstehen, ist eine cytologische Charakterisierung dieser Kalluskulturen notwendig gewesen.

Kalluskulturen sind im allgemeinen morphologisch sehr heterogen (STREET 1966, HALPERIN 1969, NASH und DAVIES 1972, STREET 1973 u.a.). Neben den

verschiedensten Zellformen kann vor allem der Grad der Zellaggregation stark variieren (TORREY und REINERT 1961, LIAU und BOLL 1971, u.a.) Dem Bild entsprechen junge Kalluskulturen von *Daucus carota*, denn sie bestehen aus zahlreichen Einzelzellen unterschiedlichster Form und Größe, kleineren und größeren Zellgruppen und vor allem vielen Zellaggregaten aus kleinen, rundlichen, plasmareichen Zellen und zeichnen sich dadurch aus, daß sie Embryonen bilden.

Zu dem divergierenden äußeren Erscheinungsbild solcher Kalluskulturen können beträchtliche Unterschiede im Stoffwechsel bestimmter Aggregate bzw. Zelltypen festgestellt werden, wie es z.B. hinsichtlich der Cytochromoxodase-, Peroxidase- und Katalase-Aktivität De JONG, JANSEN und OLSEN (1967) und VERMA und VAN HYSTEE (1970) nachgewiesen haben.

Derartige morphologische und biochemische Unterschiede in der Kalluszusammensetzung können vom Originalgewebe abjängen, werden bei der Kallusbildung aber vor allem durch die spezifischen Komponenten der Medien wie z.B. Auxin beeinflusst (TORREY und REINERT 1961), oder durch das Alter der Kultur herbeigeführt.

Signifikante Veränderungen mit dem Alter der Kultur werden in vielen Veröffentlichungen beschrieben (s. Zusfg.: YEOMAN und STREET 1973).

Neben einer zunehmenden Polyploidisierung oder Aneuploidisierung (MURASHIGE und SKOOG 1962, PARTANEN 1963 u.a.) können Änderungen in der Synthesefähigkeit eintreten (REINERT et al. 1969 u.a.).

In Abhängigkeit von Veränderungen des Karyotyps und mit der Abnahme bestimmter Syntheseleistungen der Kalluszellen ist möglicherweise auch der Verlust der Regenerationsfähigkeit der Kulturen zu sehen (REINERT 1959, 1967, 1968, 1970, SYONO 1965, HALPERIN 1965, GAUTHERET 1966, MURASHIGE und NAKANO 1966). MEYER-TEUTER und REINERT (1973) konnten feststellen, daß vorwiegend kleine, plasmareiche Zellen zur Morphogenese befähigt sind, während stark vakuolisierte Parenchymzellen diese Fähigkeit anscheinend verloren haben, und daß ein Verlust der Morphogenese eng verbunden ist mit einer Zunahme des Frischgewichts, Vergrößerung der Zellen und einer Erhöhung des Wassergehaltes. Diese Befunde decken sich weitgehend mit der Charakterisierung des alten Kallusstammes.

Der alte Kallusstamm ist ein schnell wachsender Kallus, der die Fähigkeit zur Organogenese verloren und sich im Laufe einer über sechsjährigen Kultivierung an ein und dieselben Kulturbedingungen adaptiert hat. Er zeichnet sich durch eine sehr hohe Rate lebensfähiger Zellen aus. Diese sind fast ausschließlich stark vakuolisiert, bilden in Suspension aneinanderhängende Ketten langgestreckter Zellen und teilen sich weitgehend synchron.

Damit stellt dieser Kallus ein relativ ungewöhnliches Material dar und ist gegebenenfalls noch vergleichbar mit dem Kallusstamm WR 132, der von De JONG et al. (1967) beschrieben worden ist; dabei handelt es sich jedoch um Tabaksuspensionszellen, die in solchen zylindrischen Ketten vorliegen.

Die cytologische Charakterisierung unterstützt durch biochemische Befunde sowie morphologische Aktivitäten macht es verständlich, daß Protoplasten aus dem alten Kallusstamm andere Eigenschaften besitzen als Protoplasten aus jungen Kalluszellen.

Um daher die Eigenschaften von Protoplasten besser beurteilen zu können, werden sie in der vorliegenden Arbeit mit denen intakter Zellen verglichen, aus welchen sie isoliert worden sind. Da die Isolierung und Kultivierung der Protoplasten unter erhöhtem osmotischen Druck des Mediums erfolgen muß, die Plasmolyse aber Veränderungen von Eigenschaften bewirken kann, werden zum Vergleich auch plasmolysierte Zellen herangezogen.

Mit der Parallelkultur von Zellen, plasmolysierten Zellen und Protoplasten liegt ein abgerundetes Versuchssystem mit entsprechenden Kontrollmöglichkeiten vor, das in dieser Form eine breitere Basis zum Verständnis der Eigenschaften und Fähigkeiten isolierter Protoplasten bieten kann.

Zwar haben auch GIGOT, SCHMITT und HIRTH (1973) darauf hingewiesen, daß ein Vergleich der Protoplasten mit den ursprünglichen Zellen notwendig ist, um den Einfluß der einzelnen Präparationsschritte auf die Ultrastruktur von Zellen bzw. Protoplasten besser erfassen zu können, doch beschränken sich ihre Untersuchungen nur auf einen Zeitraum von 3 bis 6 Stunden, der zur Gewinnung von Protoplasten ausreicht. Sie bedauern, daß meistens nur Protoplasten, wie bei BENDADIS et al. (1973), COCKING und POJNAR (1969) u.a., selten aber das Ausgangsmaterial zum Vergleich strukturell untersucht wird, wodurch die Auswirkungen von Plasmolytikum und Enzym nicht erfaßt werden. Daß der Isolierungsprozeß einen gravierenden Eingriff in die Zellstrukturen und den Stoffwechsel darstellt, wird andererseits von vielen Seiten hervorgehoben (COCKING 1972, RUESINK 1971, 1973, PILET et al. 1973, JONES et al. 1973, WALLIN et al. 1973 u.a.).

Erst in neuerer Zeit werden mehr komparative Studien durchgeführt (FOWKE et al 1972 u.a.)

Durch das Versuchssystem dieser Arbeit wird die Interpretation der Ergebnisse erheblich erleichtert und von mehreren Seiten fundiert. Das

zeigt sich besonders deutlich bei der Beurteilung mehrkerniger Protoplasten.

Schon in den ersten Versuchen mit dem alten Kallusstamm von *Daucus carota* sind nach kurzer Kulturdauer vielkernige Protoplasten teilweise mit deutlichen Kernteilungsfiguren im synchronen und asynchronen Stadium beobachtet worden (HELLMANN und REINERT 1971, REINERT und HELLMANN 1971).

Ein ähnliches Phänomen ist auch von ERIKSSON und JONASSON (1969) mit Protoplasten aus Zellkulturen von *Haplopappus gracilis* beschrieben worden.

Über homokaryontische, polynucleare Protoplasten haben etwa zur gleichen Zeit MOTOYOSHI (1971), BAWA und TORREY (1971), POWER, FREARSON und COCKING (1971), MILLER et al. (1971), später auch WITHERS et al. (1972), GRAMBOW et al. (1972), KAO et al. (1973), EVANS et al. (1973), ITO (1974) u.a. berichtet.

Hauptsächlich sind zwei Möglichkeiten für das Entstehen polynucleare Protoplasten in Betracht zu ziehen: sie können durch Mitosen oder durch Fusion zweier oder mehrerer Protoplasten zustandekommen.

MOTOYOSHI (1971) führt die Vielkernigkeit seiner Protoplasten aus Maizendospermgewebe auf eine spontane Fusion mehrerer Zellen während des Abbaus der Zellwand zurück, da er sofort nach der Enzymbehandlung Protoplasten mit bis zu 28 Kernen nachweisen kann.

Spontane Fusionen machen auch POWER et al. (1971) und GRAMBOW et al. (1972) für das Auftreten ihrer polynuclearen Protoplasten verantwortlich. Von MILLER et al. (1971) werden aber auch Mitosen mit eingeschlossen, da nach 24-stündiger Kultur in ihren cytologischen Präparaten sowohl in mono- als auch polynuclearen Protoplasten aus Soyabohnen Suspensionskulturen zahlreiche, typische Kernteilungsfiguren zu finden sind. Diese Teilungen erfolgen noch vor der Zellwandbildung. WITHERS (1973) u.a. haben anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen spontane Fusionskörper nachweisen können. Solche spontanen Fusionen werden aber meist von plasmareichen Zellen, selten von hochvakuolisierten Zellen eingegangen (EVANS et al. 1973 u.a.), wobei aber auch die Isolierungsmethode spontane Fusionen begünstigen ("Ein-Schritt") oder weitgehend verhindern kann ("Zwei-Schritt", Vorplasmolyse) (POWER et al. 1971, BINDING 1974, BRIGHT et al. 1974 u.a.).

In der vorliegenden Arbeit sind spontane Fusionen zwischen Protoplasten aus jungen Kalluskulturen, insbesondere aus Aggregaten kleiner, embryonaler Zellen beobachtet worden, die über die Ausdehnung von Plasmodesmen zustande kommen, wie es COCKING 1970 u.a. beschrieben haben.

Solche intraspezifischen Fusionsprodukte können bis zu 100 Kernen enthalten (USUI, MAEDA und ITO 1974).

Problematischer und zugleich interessanter ist der Weg über die Kernteilungen. ERIKSSON et al. (1969) deuten ihre Ergebnisse als Kernteilungen, denen keine Zellteilungen gefolgt sind. BAWA und TORREY (1971) kommen zu dem gleichen Schluß. Obgleich sie keine Teilungen beobachtet haben, weisen Veränderungen wie z.B. Vergrößerung der Kerne, Zunahme der Nucleoli, sowie das Auftreten zweier Kerne nach dreitägiger Kultur, die dicht beieinander liegen auf beginnende bzw. abgeschlossene Mitosen hin. In isolierten Protoplasten aus Petunienblättern teilen sich zunächst die Kerne und führen zu binuclearen Stadien. Nach einer Wandregeneration finden dann Kern- und Zellteilungen koordiniert statt (FREARSON in COCKING 1972).

Daß ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen Kern- und Plasmateilung nicht immer zwingend sein muß, zeigen Algen- und Pilzgruppen, bei denen vielkernige Zellen entstehen. COCKING (1972) erinnert auch an den coenocytischen Zwischenzustand bei der Endospermenentwicklung, wo zunächst eine Reihe mitotischer Teilungen vor cytokinetischer Teilungen abläuft, d. h. der freien Kernteilung eine Vielzellbildung folgt.

Auf Grund folgender Beobachtungen ist die Vielkernigkeit in Protoplasten aus alten Kalluskulturen von *Daucus carota* in erster Linie auf Mitosen zurückzuführen (REINERT und HELLMANN 1973).

Spontane Fusionen sind nicht beobachtet worden und können weitgehend ausgeschlossen werden, denn es handelt sich bei diesem Kallus um stark vakuolisierte Zellen, die vor der Isolierung vorplasmolysiert werden, wodurch die Plasmodesmen zu den Nachbarzellen zerreißen, die für eine spontane Fusionierung erforderlich sind. Außerdem wird zum Abbau der Zellwand mit Cellulase eine lange Inkubationszeit benötigt, wodurch die Fusionschancen weiter herabgesetzt werden. Versuche zur Fusionsfähigkeit von Subprotoplasten mit diesen Zellen haben außerdem gezeigt, daß nach längerer Plasmolysezeit nicht einmal die Plasmahälften ein und derselben Zellen mehr verschmelzen können. Diese Befunde entsprechen im wesentlichen den Beobachtungen von KÜSTER (1909), der Veränderungen der äußeren Plasmamembranen dafür verantwortlich macht.

Für Mitosen spricht dagegen, daß 1. die Vielkernigkeit im Laufe der Kultivierung auftritt und nicht gleich nach der Isolierung, 2. vorwiegend zunächst Zwei-Kern- und später Vier- und Mehrkernstadien vorliegen, 3.. deutliche Kernteilungsfiguren auftreten. Und schließlich hat sich durch Paralleluntersuchungen eindeutig feststellen lassen, daß Kernteilungen zum gleichen Zeitpunkt in Zellen, plasmolysierten Zellen und Protoplasten stattfinden, d.h. die Protoplasten nur entsprechend den Eigenschaften der Kalluszellen reagieren. (Auch WALLIN et al. (1974) sehen die Anzahl binuclearer Protoplasten als eine Funktion mitotischer Frequenz in Suspensionszellen an).

Der alte Kallusstamm von *Daucus carota* hat sich wahrscheinlich auf Grund langer Gewöhnung an stets gleichbleibende Kulturbedingungen auf einen bestimmten Wachstums-Rhythmus eingestellt. So ist zwei bis vier Tage nach Übertragung in frisches Medium eine starke Teilungsaktivität zu verzeichnen, (und wie aus Untersuchungen der Lebensfähigkeit zu entnehmen ist, steigt die Zahl lebender Zellen an), Gemäß ihrem fädigen, langgestreckten Charakter nehmen die Zellen dann hauptsächlich in der Länge zu, während die Breite gemessen an den Querwänden relativ konstant bleibt, - Beobachtungen, die ganz den Befunden von De JONG et al. (1967) mit "Fadenzellen" in Tabaksuspensionskulturen entsprechen. Zwischen dem 8. und 10. Tag teilen sich die Zellen wieder. Nach 14 Tagen werden die Suspensionskulturen subkultiviert und der Rhythmus kann sich in gleicher Weise wiederholen, wodurch eine hohe Synchronität erreicht wird (vgl. YEOMAN 1974). Möglicherweise wird die Synchronität der Teilungen noch durch den "fädigen" Charakter begünstigt bzw. verstärkt, denn in kettenförmig aneinanderhängenden Zellen kann eine sich teilende Zelle alle anderen zu Mitosen induzieren (JONES et al. 1960, BERGMANN 1960, YEOMAN und STREET 1973).

Die Entnahme der Zellen zur Isolierung von Protoplasten erfolgt acht Tage nach Überführung in frisches Medium. Dem Zellrhythmus entsprechend befinden sich die meisten Zellen gerade im Stadium stärkster Vakuolisierung, sie sind langgestreckt und kurz vor der Kernteilung, d.h. bereits in der G_2 -Phase, wenn nicht schon der mitotischen Phase, d.h. aber, daß die Kernteilungen in den Protoplasten dem Teilungsrhythmus der Zellen entsprechend ablaufen. Dies wird besonders deutlich, da auch zur Zeit der zweiten größeren Teilungsphase der Zellen um den 10. Tag, auch in den Protoplasten wieder Kernteilungen zu beobachten sind.

Während aber in den Zellen jeder Kernteilung eine normale Zellteilung folgt, bleiben die Protoplasten ungeteilt und werden dadurch mehrkernig. Es ist zu vermuten, daß die Induktion zur Kernteilung in einem anderen Bereich liegt als diejenige der Zellteilung, da über den Weg der Protoplastenisolierung anscheinend eine Entkopplung beider Vorgänge, d.h. der Karyokinese von der Cytokinese möglich ist. Demnach ist zwar nicht der Kern- aber der Zellteilungsmechanismus durch die Isolierungsbehandlung in diesen Zellen blockiert, umgestimmt oder verzögert worden.

Da in plasmolysierten Zellen teilweise ebenfalls zwei Kerne gefunden worden sind, kann gefolgert werden, daß weniger durch das Enzym als das durch Plasmolytikum der Zellteilungsmechanismus beeinflusst wird. Zu dem selben Schluß kommen auch ERIKSSON et al. (1974), die das gleiche Phänomen mit Suspensionszellen von Karotten und *Haplopappus gracilis* beobachtet haben, wenn diese in Medien mit hohem osmotischen Druck kultiviert worden sind.

Auf positive und negative Einflüsse des Plasmolytikums ist schon mehrmals hingewiesen worden, und es wird aus diesen Beobachtungen besonders deutlich, daß das Plasmolytikum wohl der problematischste Faktor des ganzen Protoplasten-Systems ist, wie es auch RUESINK (1971), COCKING (1972) und ERIKSSON et al. (1974) betonen.

Das Plasmolytikum hat sowohl einen physikalischen, als auch chemischen und damit stoffwechselphysiologischen Effekt, wodurch gravierend in die Struktur und Funktion der Zelle eingegriffen wird. Möglicherweise sind durch die primäre Veränderung des Wasserhaushaltes alle anderen Erscheinungen als sekundäre Folgen zu bewerten. In den stark vakuolisierten Zellen des alten Kallusstammes zieht sich unter Einwirkung von 0,6 M Sorbit das Protoplasma völlig von den Zellwänden zurück, die Protoplasten kugeln sich stark ab, die Plasmodesmen zu den Nachbarzellen reißen ab, im Verlauf längerer Plasmolyse zerreißen sogar die Hecht'schen Fäden, und die Zellen isolieren sich vollständig voneinander. Nach dem Verlust der Zellwand ist die Isolierung perfekt. Das bedeutet aber: 1. den Abbruch des Kontaktes der Protoplasten mit der Zellwand und damit möglicherweise den Verlust einer "Zellwandmatrix", 2. die Loslösung von den Nachbarzellen und damit die Verhin-

derung eines Stoffaustausches zwischen den Zellen, die unter Umständen nur aus diesem Grunde Ketten oder Aggregate gebildet haben, 3. einen Volumenverlust und dadurch bedingt eine Abnahme des Turgordruckes, und 4. eine enorme Oberflächenverkleinerung verbunden mit Permeabilitätsänderungen, die sich auf Stoffauf- und -abgabe auswirken.

Durch die Plasmolyse erfahren alte Kalluszellen einen Zellsaftverlust von 70 %, die Oberflächenverringerung kann zwischen 30 % und 60 % betragen (je nach Länge der Zellen, bei etwa konstanter Breite von 30 μ). RUESINK (1966) rechnet je Zelltyp mit einem Oberflächenverlust von mindestens 25 % und weist in diesem Zusammenhang auf die Folgen für die Stoffaufnahme hin.

In weniger stark vakuolisierten Zellen wie z. B. denen des jungen Kallusstammes, bewirkt die Plasmolyse entsprechend keinen völligen Abbruch der Kontakte und eine geringere Oberflächenveränderung. Bereits dieser Unterschied kann das nachfolgende Verhalten der Protoplasten bestimmen.

In ausführlichen Untersuchungen über den osmotischen Effekt auf vakuolisierte und nicht vakuolisierte Zellen hat GREENWAY (1970) gezeigt, daß strukturelle sowie stoffwechselphysiologische Änderungen der Zellen eintreten, und daß nur nicht vakuolisierten Zellen zum ursprünglichen Zustand nach Beseitigung des Osmotikums zurückkehren. GIGOT et al. (1973) berichten über strukturelle Veränderungen insbesondere des Kerns und der Mitochondrien unter hohen osmotischen Bedingungen, die nur innerhalb von sechs Stunden unter partieller Deplasmose reversibel sind.

Wird das Osmotikum nicht beseitigt, so ist in den eigenen Versuchen eine weitgehend "endogene" Deplasmolyse in den Zellen beobachtet worden. Diese ist sowohl von der Zeit als auch von der Konzentration des Plasmolytikums abhängig. Einen Konzentrationsausgleich erreichen alle Kalluszellen spätestens nach drei Tagen, wenn die Konzentration 0,2 M Sorbit beträgt. Bei einer 0,6M Sorbitlösung deplasmolisieren nur 5 % der Zellen. Aus Untersuchungen des Frischgewichtszuwachses sowie des Plasmolysezustandes der Zellen unter verschiedenen Plasmolytika kann abgeleitet werden, daß nur die Zellen überleben, die sich deplasmolisieren können.

Die starke Wachstumshemmung unter hohen osmotischen Außenbedingungen ist Ausdruck eines verminderten Stoffwechsels und einer herabgesetzten Syntheseleistung.

So kann GREENWAY (1970) zeigen, daß unter dem Einfluß von Osmotika die aerobe Atmung stark abfällt und die Glucoseaufnahme sowie die Bildung methanolunlöslicher Komponenten gehemmt wird. Eine Abnahme der Stärke- und Proteinsynthese stellen HILLER et al. (1968) fest, eine Veränderung des Zucker- und Aminosäurepools MARETZKI et al. (1969).

RUESINK weist nach, daß in Abhängigkeit von einer Osmotikumkonzentration von 0,5 M die Leucinaufnahme auf ca. 30 % herabgesetzt ist, und führt dies auf Veränderungen der Membraneigenschaften zurück. Eingriffe in den Wasserhaushalt der Zellen durch hohen osmotischen Druck bewirken starke Verschiebungen des Phytohormonspiegels (in ERIKSSON et al. 1974). Daß sich daraus vielfältige Veränderungen struktureller sowie stoffwechsel-physiologischer Art ergeben, braucht nicht besonders hervorgehoben zu werden; nicht ohne Grund wird vom "osmotischen Schock" gesprochen.

ERIKSSON et al. (1974) hat - den Ergebnissen dieser Arbeit entsprechend - festgestellt, daß bei der Überführung von Suspensionszellen in Medien mit hohem osmotischen Druck, die meisten Zellen absterben und nur solche überleben, die sich dem Medium anpassen können. Ihrer Argumentation, daß eine vorherige Adaptation der Zellen an das Osmotikum die Isolierung und Kultivierung von Protoplasten erleichtern würde, kann aber nicht zugestimmt werden, da zur Stabilität der Protoplasten dann noch höhere osmotische Werte notwendig wären und damit sich das Problem nur in einen anderen Konzentrationsbereich verschieben würde.

Es erscheint sinnvoller, den Vorgang der Deplasmolyse auf natürlichem Wege zu erleichtern, um auf diese Weise die Turgeszenz der Zellen und die Oberflächenverringerung wenigstens teilweise reversibel zu machen und dadurch die Stoffaufnahme, Respiration und Syntheseleistung zu normalisieren.

Insbesondere sind hiermit Syntheseleistungen gemeint, die für die Zellwandregeneration notwendig sind.

So wird die Zellwand schneller aufgebaut, wenn die Sorbitkonzentration auf 0,3 M herabgesetzt wird. Die Überwindung des stark plasmolisierenden Effekts und damit die Wiederherstellung eines stoffwechselaktiven Zustandes kann auch erleichtert werden, wenn statt eines einzelnen Plasmolytikums ein Gemisch osmotisch wirksamer Substanzen verwendet wird oder aber dem Medium permeabilitätsändernde Stoffe zugesetzt werden. So haben WALLIN et al. (1973) ihr Medium erfolgreich mit einem Gemisch aus Saccharose, Sorbit und Polyäthylenglycol verbessern können. KAO et al. (1971) führen die regenerationsfördernde Wirkung auf Calcium zurück, und zum gleichen Zweck ändert BINDING (1974) das Medium durch Zugabe von $MgSO_4$ und $CaCl_2$ ab. Neben bestimmten Kohlenhydraten und Ionen sind vor allem Auxin und Cytokinine wesentliche Faktoren bei der Zellwandbildung (NITSCH et al. 1971, GRAMBOW et al. 1972, TAKEBE et al. 1973, GAMBORG et al. 1973). So liegen inzwischen zahlreiche Veröffentlichungen über die Regeneration einer Zellwand bzw. der Zellwand ähnlicher Strukturen vor (POJNAR et al. 1967, NAGATA et al. 1970, PRAT et al. 1971, HORINE et al. 1972, FOWKE et al. 1973 u.v.a.).

NAGATA et al. (1971) können bereits am 2. Tage nach der Isolierung von Tabakblätterprotoplasten an 60-80% eine Zellwand nachweisen. In den meisten Fällen dauert es 2-4 Tage bis sich eine neue Zellwand regeneriert. (KAO et al. 1970, KAMEYA et al. 1972, POTRYKUS et al. 1972, GILES 1972, BURGESS et al. 1973, WATTS et al. 1973, GLEBA et al. 1974, MEYER et al. 1975 u.a.) Diese Zeitspanne entspricht auch den eigenen Beobachtungen mit Protoplasten aus jungen Kalluskulturen von *Daucus carota*. Interessanterweise bilden Protoplasten aus Blättern leichter neue Zellwände als Protoplasten aus Kalluskulturen (COKING et al. 1973). GAMBORG et al. 1973 machen dafür die Chloroplasten verantwortlich, die zusätzlich Kohlenhydrate für den Aufbau der Zellwand synthetisieren. Vermutlich sind Chloroplasten aber auch für die Osmoregulation von Bedeutung. Erst nach der Zellwandbildung, selbst wenn es sich nur um eine "Pseudowand" handelt (MEYER et al. 1975), setzen die ersten Zellteilungen ein, in den meisten Fällen zwischen dem 2. und 5. Tag (NAGATA et al. 1970, OMYAMA et al. 1972, WALLIN et al. 1973, VASIL et al. 1973, MARETZKI et al. 1973, MESSERSCHMIDT 1974, GOSCH, BAJAJ und REINERT 1975 u.a.)

Zellteilungen ohne Wandbildung sind bisher nicht beobachtet worden. Damit scheint sich die von vielen Seiten geäußerte Vermutung zu bestätigen, daß die Zellwand eine notwendige Voraussetzung zur Cytokinese bei höheren Pflanzen ist (COCKING 1972, GAMBORG et al. 1973, VASIL et al. 1973 u.a.).

Um die Frage zu klären, warum unter gleichen Kulturbedingungen, die einen Protoplasten eine Zellwand regenerierten, die anderen aber nicht, ist zunächst eine kritischere Auseinandersetzung mit dem Prozeß des Auf- und Abbaues der Zellwände notwendig.

In neueren Veröffentlichungen wird der Zellwandabbau wesentlich vorsichtiger beschrieben, so sprechen z.B. HANKE et al. (1974) nur noch von der Abwesenheit einer kontinuierlichen Wand als Ergebnis der Isolierung.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen fibrilläre Strukturen in und an den Protoplasten. Bei diesen kann es sich sowohl um übriggebliebene als auch um neu synthetisierte Wandkomponenten handeln (POJNAR et al. 1967, WILLISON et al. 1972, PRAT 1971). RUESINK (1973), BURGESS (1973), BRIGHT et al. 1974 u.a. halten es für möglich, daß die Wandbildung von der Anwesenheit einer Restwand abhängig ist, d.h. daß die Zelle einen "primer" bzw. eine Matrix zur Wandsynthese benötigt. Da die Wand partiell verschieden schnell aufgelöst wird, könnte es möglich sein, daß die Zellen größere Wandkomplexe über Vesikel inkorporieren, die ihnen dann als Matrix für die Synthese dienen. Da in vakuolisierten Zellen sich das Plasmalemma gänzlich von der Wand zurückzieht, ^{wird} diese vollständiger beseitigt; daraus ließe sich erklären, warum gerade bei Protoplasten aus vakuolisierten Zellen die Wandbildung am ehesten unterbleibt.

Das Problem eines "primer" 's fällt weniger ins Gewicht, wenn der Prozeß des Zellwandaufbaus mehr unter dem Gesichtspunkt einer Regeneration als einer de novo Synthese der Zellwand betrachtet wird, zumal bei der Isolierung durch den enzymatischen Eingriff der Abbau nur überwiegt, der Aufbau aber nicht völlig ausgeschaltet ist, sodaß der Protoplast die Zellwand nur im Sinne einer "Reparatur" wiederherzustellen braucht.

Nach PRAT 1973, NAGATA und YAMAKI 1973, MEYER et al. 1975 u.a. sind drei Phasen der Wandrestitution zu unterscheiden:

Die erste betrifft die Polysaccharidsynthese, die zweite die Exkretion und die dritte die Ansammlung des Wandmaterials an der Oberfläche der Protoplasten.

Die erste Phase hängt vom Medium aber auch von der Wachstumsphase der Zelle ab. Durch bestimmte Kulturmedien kann der Aufbau der Polysaccharide unterstützt und damit die Regeneration gefördert werden. (s.o.). Zellen, die sich in einer aktiven Phase des Zellwandaufbaus befinden, kompensieren möglicherweise den enzymatischen Eingriff schneller. Wahrscheinlich wird aus diesem Grund bei der Isolierung von Protoplasten aus Tabakmesophyllzellen in der Literatur ausdrücklich auf die Verwendung noch aktiv wachsender Blätter Wert gelegt (POWER et al. 1971, COUTTS 1973, OMYAMA et al. 1972).

Wenn es trotz erhöhter Polysaccharidsynthese und regenerationsförderndem Medium nicht zur Wandbildung kommt, so kann es auch an der zweiten und dritten Phase (Exkretion und der Ansammlung der Wandsubstanzen) liegen, die beide stark von der Integrität des Plasmalemmas abhängig sind. Zusätzlich kann es sich noch um ein bestimmtes Oberflächen/Volumen Verhältnis handeln. So dürfte für stark vakuolisierte Protoplasten mit dünnem Plasmabelag eine Wandregeneration schwieriger sein als für plasmareiche. In Abhängigkeit von Vermögen der Protoplasten, Zellwandmaterial an ihrer Oberfläche festzuhalten, ist mit schnellerer, langsamerer oder keiner Wandbildung zu rechnen. Im letzteren Fall wäre zu erwarten, daß sich das Kulturmedium mit Polysacchariden anreichert; dies haben HORINE et al. 1972 auch tatsächlich nachweisen können.

In diesem Zusammenhang kommt es auch möglicherweise zu unvollständiger oder ungleichmäßiger Wandbildung, die das "budding" bewirken könnte, wie es in dieser Arbeit, aber auch von BAWA et al. 1971, HORINE et al. 1972, BOGERS 1973 u.a. beobachtet worden ist. In vielen Veröffentlichungen wird hervorgehoben, daß sich die Zusammensetzung der neuen Zellwand von derjenigen der Ausgangszellen unterscheidet (PRAT et al. 1971, HORINE et al. 1972 u.a.). HANKE et al. 1974 haben festgestellt, daß z.B. Pektine fehlen, da diese in das Medium diffundieren und führen darauf das "budding" zurück.

Da eine Zellwandbildung normalerweise vom Phragmoplasten ausgeht, muß die Bildung einer Zellwand durch Protoplasten als ungewöhnliche Situation angesehen werden (TAKEBE et al. 1973). Während viele Protoplasten unter diesen Bedingungen eine Wand regenerieren, können es andere nicht.

Zu diesen zählen Protoplasten aus dem alten Kallusstamm von *Daucus carota*, (HELLMANN und REINERT 1971), ebenso diejenigen aus Mesophyllzellen des Grases *Digitaria sanguinalis* (GILES 1972), aber auch Protoplasten aus

Avenacoleoptilen (RUESINK 1973), sowie die aus crown-gall Kallus von *Parthenocissustrianspidata* (COCKING et al. 1973). Sowohl die Kalluskulturen, die Mesophyllzellen als auch die Avena-coleoptilzellen sind stark vakuolisierte, aber zugleich schnell wachsende Zellen. Die Zellen der Avena-coleoptile befinden sich in starkem Streckungswachstum, ebenfalls die der Grasblätter. Auf Grund ihres "fädigen" langgestreckten Charakters ist auch bei den alten Kalluszellen die Längswachstumsrichtung bevorzugt, sodaß ein intensiver Stoffaustausch der Zellen untereinander wahrscheinlich ist und gegebenenfalls durch einen Gradienten bestimmt wird. Im Falle der Avena-coleoptile ist der gerichtete Auxintransport nachgewiesen.

Für solche Zellen könnte der Abbruch der Zellkontakte durch hohen osmotischen Druck des Mediums von einschneidender Bedeutung sein und zum Verlust bestimmter Fähigkeiten führen.

Die Notwendigkeit eines intercellulären Kontaktes durch Plasmodesmen zur Induktion bestimmter Syntheseleistungen in anderen Zellen haben JONES et al. (1973) mit ihren Versuchen demonstrieren können. Durch 0,6 M Polyäthylenglycol wird die α -Amylaseproduktion im Aleurongewebe von Gerstensamen vollständig gehemmt. Diese Hemmung führen JONES et al. (1973) auf den Abbruch intercellulärer Verbindungen im Gewebeverband zurück, da dadurch der Gibberellintransport unterbrochen wird.

Es wäre denkbar, daß durch den Isolierungsprozeß bei der Protoplastengewinnung Zellen bestimmte Syntheseleistungen wie z.B. auch die der Wandbildung verlieren, zu denen sie im Zellverband fähig sind.

Ob es sich bei den Beziehungen der Zellen des alten Kallus zueinander um einen Wuchsstoffgradienten handelt oder um bestimmte Stoffzufuhr für Stoffwechselreaktionen, wäre zu untersuchen.

Daß "Fadenzellen" eine unterschiedliche Enzymausstattung haben, ist von De JONG et al. (1967) an zylindrischen Zellketten aus Tabakmesophyllsuspensionskulturen in cytochemischen Analysen unter anderem für die Malat- und Succinatdehydrogenase nachgewiesen worden. Auf Grund der RNA-Verteilung in diesen Zellen vermuten sie zudem eine bestimmte Orientierung von einem Ende der Kette zum anderen.

Dies würde aber bedeuten, daß solche Kettenzellen polarisiert sind, in einem bestimmten Ausmaß zur Arbeitsteilung und damit zu einer speziellen Form der Differenzierung übergegangen sind, die möglicherweise als Konkurrenz zur Embryobildung im Laufe der Kultur zu werten ist.

Die Bildung von Zellfäden kann eine Einschränkung, aber auch einen irreversiblen Verlust von Kompetenzen zur Folge haben, zumal die Kultivierung stets unter konstanten Bedingungen abläuft und für die Zellen über viele Generationen hin keine Notwendigkeit bestanden hat, sich neuen Bedingungen anzupassen. So könnten sich einzelne Zellen in diesem Verband hinsichtlich ihrer Enzymmuster und Syntheseleistungen den Aussenbedingungen in positiver "ökonomischer" Richtung adaptiert haben.

Die Isolierung von Protoplasten aus diesen Zellketten kann den Verlust eines gerichteten Austausches hormonaler oder auch enzymatischer Faktoren zwischen den Nachbarzellen bewirkt und dadurch bestimmte Synthesefähigkeiten des einzelnen Protoplasten beeinträchtigt haben, wie die zur Wandregeneration.

Als Folge der Wandlosigkeit wachsen die Protoplasten als Einzelindividuen zu "Riesenkugeln" heran. Innerhalb 28 Tagen kann der Zuwachs an Volumen über 5000%, der Zuwachs an Oberfläche über 1300% betragen.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Protoplasten aus verschiedenen Geweben von *Daucus carota* ließen sich auf enzymatischem Wege isolieren und in vitro kultivieren. Sie hatten unterschiedliche Eigenschaften und konnten unter anderem zu mehrkernigen "Riesenprotoplasten" heranwachsen oder zu Kalluszellen regenerieren.

- A. Eine optimale Isolierung war vom Charakter des Gewebes (Zelltyp, Aggregation, spezifische Zellwandzusammensetzung), der Enzympräparation (Reinheitsgrad, Aktivität) und vom Plasmolytikum abhängig und wurde von mehreren Faktoren insbesondere der Zusammensetzung des Mediums, pH-Wert, Temperatur und Inkubationszeit beeinflusst.

Protoplasten aus Kalluskulturen konnten unter folgenden Bedingungen isoliert werden: 30 min. Vorplasmolyse der Zellen in Medium M_s mit 0,6 M Sorbit, anschließend Inkubation bei 28°C im Dunkeln von 100-200 mg Kallus in 10 ml Isolierungslösung (5% Cellulase, 0,6 M Sorbit, Medium M_s , pH = 5).

Aus dem alten Kallusstamm ließen sich auf diese Weise vollständig reine Protoplasten als saubere Suspension gewinnen.

Aus jungen Kalluskulturen konnten maximal 60% Protoplasten isoliert werden, die vor dem Kultivieren mit einem kombinierten Filtrations- und Zentrifugations-Verfahren von Zellresten gereinigt werden mußten.

Für Protoplasten aus Blättern, Wurzeln und Adventivembryonen enthielt das Isolierungsmedium zusätzlich 2,5% Macerocym.

- B. Eine Kultivierung von Protoplasten war sowohl als Suspensionskultur als auch als Agarkultur, d.h. in flüssigem oder festem Nährmedium auf Platten möglich.

Als vollsynthetisches Nährmedium wurde das modifizierte Medium nach MURASHIGE und SKOOG (1962) M_s (REINERT et. al. 1966) mit einem osmotischen Stabilisator (0,3-0,6 M Sorbit) verwendet.

Die durchschnittliche Protoplastendichte betrug 10^5 /ml.

Die Kultur erfolgte unter aseptischen Bedingungen im Dunkeln bei 28°C.

- C. Die Lebens-, Fusions-, Regenerations- und Teilungsfähigkeit isolierter Protoplasten wurde mit Hilfe lichtmikroskopischer Methoden (Hellfeld, Dunkelfeld, Phasenkontrast-, Fluoreszenz- und Polarisationsoptik; Vitalfärbungen, sowie Färbungen fixierten Materials) untersucht.

Ein zweifach vergleichendes Versuchssystem

- a) gleichzeitige Beobachtung von Protoplasten, sowie Zellen, aus denen sie isoliert wurden, als auch dieser Zellen im plasmolysierten Zustand.
- b) Parallelkulturen von Protoplasten aus einem jungen Kallus und aus dem alten Kallusstamm

führte zu folgenden Ergebnissen:

Die jungen Kalluskulturen waren von sehr heterogener Zellzusammensetzung (viele Zellaggregate, kleiner, embryonaler Zellen, Zellgruppen und Einzelzellen verschiedener Form und Größe) und befanden sich auf dem Höhepunkt der embryonalen Phase.

Protoplasten aus diesen jungen Kalluskulturen fusionierten spontan, bildeten nach drei Tagen neue Zellwände, teilten sich und entsprachen wieder Kalluszellen.

Der alte Kallusstamm - über sechs Jahre an gleiche Kulturbedingungen adaptiert - war ein homogener, schnell wachsender Kallus mit einer hohen Rate (90%) lebensfähiger Zellen, die in Suspension als Ketten langgestreckter Zellen vorlagen. Sie teilten sich weitgehend synchron und bildeten keine Embryonen mehr.

Protoplasten aus diesem alten Kallusstamm neigten nicht zu Fusionen, regenerierten keine Zellwände, zeigten Kern- aber keine Zellteilungen und wurden dadurch im Laufe der Kultur mehrkernig. Sie nahmen in Abhängigkeit vom Plasmolytikum erheblich an Größe zu (innerhalb von 28 Tagen erfuhren sie in Medien mit 0,6 M Sorbit eine 21-fache, mit 0,4 M eine 39-fache, mit 0,3 M eine 56-fache Volumenvergrößerung) und waren lange lebensfähig (25% über 5 Monate, vereinzelt über ein Jahr).

Die Bewertung der Ergebnisse erfolgte unter besonderer Berücksichtigung der Effekte des Plasmolytikums.

Für die Entstehung der Vielkernigkeit wurde die Möglichkeit der spontanen Fusion oder der Kernteilung ohne nachfolgende Zellteilung in Betracht gezogen.

Weiterhin wurde die Funktion der Zellwand bei der Stoffaufnahme und der Cytokinese sowie die Differenzierung im Zellverband im Vergleich mit isolierten Protoplasten diskutiert.

LITERATURVERZEICHNIS

- ALBERSHEIM, P.: The primary cell wall.
pp. 15-25 In: Colloq. Internat. CNRS (Versailles)
Protoplastes et fusion de cellules somatiques
végétales. Edition de l'Institut National de la
Recherche Agronomique, Paris 1973
- AOKI, S. und TAKEBE, I. (1969): Infection of tobacco mesophyll
protoplasts by tobacco mosaic virus ribonucleic acid.
Virology 39, 439-448
- BAJAJ, Y.P.S. (1972): Protoplast culture and regeneration of
haploid tobacco plant.
Amer. J. Bot. 59 (6), 647
- BAJAJ, Y.P.S. (1974): Potentials of protoplast culture work in
Agriculture.
Euphytica 23, 633-649
- BAWA, S.B. und TORREY, J.G. (1971): "Budding" and nuclear di-
vision in cultured protoplasts of Convolvulus and
onion.
Bot. Gaz. 132, 240-245
- BAYER, M.H.: Effect of auxin on isolated mesophyll protoplasts.
In: Abstracts: Plenary papers, concurrent papers.
Leicester 1974
- BENBAIDS, A. und BAUMANN, F.: Etude comparative de protoplasmes
obtenus par traitement enzymatique á partir de
divers tissus: étude ultrastructurale et culture in
vitro.
pp. 189-205 In: Colloq. Internat. CNRS (Versailles)
Protoplastes et fusion de cellules somatiques
végétales. Edition de l'Institut National de la
Recherche Agronomique, Paris. 1973
- BERGMANN, L. (1960): Growth and division of single cells of
higher plants in vitro.
J. gen. Physiol. 43, 841-851
- BINDING, H. (1966): Regeneration und Verschmelzung nackter
Laubmoosprotoplasten.
Z. Pflanzenphysiol. Bd. 55, 305-321
- BINDING, H. (1974): Fusionsversuche mit isolierten Protoplasten
von Petunia hybrida L.
Z. Pflanzenphysiol. Bd. 72, 422-426

- BINDING, H. (1974): Regeneration von haploiden und diploiden Pflanzen aus Protoplasten von *Petunia hybrida* L.
Z. Pflanzenphysiol. Bd. 74, 327-356
- BLASCHEK, W., HESS, D. und HOFFMANN, F. (1974): Transkription in aus Protoplasten isolierten Zellkernen von *Nicotiana* und *Petunia*.
Z. Pflanzenphysiol. Bd. 72, 262-271
- BÖRNER, R. (1973): Zur Isolierung von Membranfraktionen aus Protoplasten nach deren präparativer Gewinnung aus Blättern von *Bryophyllum daigremontianum*.
Biol. Zbl. 92, 583-594
- BOGERS, R.J.: The use of protoplasts for the study of root nodule symbiosis in *Pisum sativum*.
p.p. 397-407 In: Colloq. Internat. CNRS (Versailles) Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales Edition de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Paris. 1973
- BOULWARE, M.A. und CAMPER, N.D. (1972): Effects of selected herbicides on plant protoplasts.
Physiologia Pl. 26, 313-317
- BOURGIN, J.P., CHUPEAU, Y. und MOREL, G. (1972): Obtention et culture in vitro de protoplastes multinucléées de mésophylle de tabac (*Nicotiana tabacum* L.).
C.R. Acad. Sci. Ser. D. 274 (26), 3545-3548
- BRIGHT, S.W. und NORTHCOTE, D.H. (1974): Protoplast regeneration from normal and bromodexyuridine-resistant sycamore callus.
J. Cell. Sci. 16, 445-463
- BUI-DANG-HA, H.: Regeneration of complete plants of *Asparagus* from protoplasts culture.
- BURGESS, J., WATTS, J.W., FLEMING, E.N. und KING, J.M. (1973): Plasmalemma fine structure in isolated tobacco mesophyll protoplasts.
Planta 110, 291-301
- BURGESS, J., MOTOYOSHI, F. und FLEMING, E.N. (1973): Effect of poly-L-ornithine on isolated tobacco mesophyll protoplasts. evidence against stimulated pinocytosis.
Planta 111, 199-208
- BURGESS, J., MOTOYOSHI, F. und FLEMING, E.F. (1974): Structural changes accompanying infection of tobacco protoplasts with two spherical viruses.
Planta 117, 133-144

- BURGESS, J. und FLEMING, E.F. (1974): Ultrastructural studies of the aggregation and fusion of plant protoplasts. *Planta* 118, 183-193
- BURGESS, J., MOTOYOSHI, F. und FLEMING, E.N. (1974): Structural and autoradiographic observations of the infection of tobacco protoplasts with pea enation mosaic virus. *Planta* 119, 247-256
- BURGESS, J. und FLEMING, E.N. (1974): Ultrastructural observations of cell wall regeneration around isolated tobacco protoplasts. *J. Cell Sci.* 14, 439-449
- BUTENKO, R.G. und IVANTSOV, A.I.: The isolation of protoplasts from different strains of carrot and tobacco tissue cultures. pp. 79-84 In: *Colloq. Internat. CNRS (Versailles) Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales* Edition de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Paris. 1973
- CAVALLI-SFORZA, L.: Biometrie. Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik. Gustav Fischer Verlag Stuttgart 1969
- CARLSON, P.S., SMITH, H.H. und DEARING, R. (1972): Parasexual interspecific plant hybridization. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash)* 96, 2292 - 2294
- CARLSON, P.S.: Towards a parasexual cycle in higher plants. pp. 548-549 In: *Colloq. Internat. CNRS (Versailles) Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales*. Edition de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, 1973.
- CHUPEAU, Y. und MOREL, G. (1970): Obtention de protoplastes de plantes supérieures à partir de tissus cultivés in vitro. *C.r.hebd.Séanc. Acad. Sci., Paris* 270, 2659-2662
- COCKING, E.C. (1960): A method für the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature (Lond.)* 187, 927-929
- COCKING, E.C. (1961): Properties of isolated plant protoplasts. *Nature (Lond.)* 191, 780-782
- COCKING, E.C. (1962): Action of growth substances, chelating agents and antibiotics on isolated root protoplasts. *Nature (Lond.)* 193, 998-999
- COCKING, E.C. (1963): The isolation of subprotoplasts of higher cells. *Biochem. J.* 88, 31-32

- COCKING, E.C. (1966): An electron microscopical study of the initial stages of infection of isolated tomato fruit protoplasts by tobacco mosaic virus.
Planta 68, 206-214
- COCKING, E.C. (1970): Virus uptake, cell wall regeneration, and virus multiplication in isolated plant protoplasts.
Int. Rev. Cytology 28, 89-124
- COCKING, E.C. (1972): Plant cell protoplasts - Isolation and development.
An. Rev. Pl. Physiol. 23, 29-50
- COCKING, E.C. (1970): Fusion of isolated protoplasts: a first step towards the somatic hybridisation of plants.
In: Colloque Int. Cent.Natl.Rech.Sci. (Paris)
193, 303-317
- COCKING, E.C. (1973): Plant cell modification; problems and perspectives.
pp. 327-341 In: Colloq. Internat. CNRS (Versailles)
Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales.
Edition de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, 1973
- COCKING, E.C. und EVANS, P.K. (1973): The isolation of protoplasts In: H.E. Street (Ed)? Plant tissue and cell culture. pp.100-120. Botanical Monographs. Blackwell Sci. Publ. Oxford
- COCKING, E.C. und GREGORY, D.W. (1963): Organised protoplasmic units of the plant cell.I. Their occurrence, origin and structure.
J. Exp. Bot. 14, 504-511
- COCKING, E.C. und POJNAR, E. (1969): An electron microscopic study of the infection of isolated tomato fruit protoplasts by tobacco mosaic virus.
J. Gen. Virol. 4, 305-312
- CONSTABEL, F., KIRKPATRICK, J.W. und GAMBORG, O.L. (1973): Callus formation from mesophyll protoplasts of *Pisum sativum*.
Can. J.Bot. 51, 2105-2106
- CONSTABEL, F. und KAO, K.N. (1974): Agglutination and fusion of plant protoplasts by polyethylene glycol.
Can.J.Bot. 52, 1603-1606
- COUTTS, R.H.A.: Viruses in isolated protoplasts, a potential model system for studying nucleo-protein replication
pp. 353-365 In: Colloq. Internat. CNRS (Versailles)
Protoplastes et fusion de cellules somatique végétales.
Edition de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, 1973

- COUTTS, R.H.A. und WOOD, K.R. (1975): The isolation and culture of cucumber mesophyll protoplasts
Plant Science Letters, 4, 189-193
- CUENDET, P. und PILET, P.E.: Auxin uptake by protoplast suspension. In: Abstracts: Plenary papers, concurrent papers.
Leicester 1974
- DAVEY, M.R. und COCKING, E.C. (1972): Uptake of bacteria by isolated higher plant protoplasts.
Nature (Lond.) 239, 455-456
- DAVEY, M.R., COCKING, E.C. und BUSH, E. (1973): Isolation of legume root nodule protoplasts.
Nature (Lond.) 244, 460-461
- DAVEY, M.R. und SHORT, K.C.: The isolation, culture and fusion of legume and cornflower leaf protoplasts.
pp. 437-453 In: Colloqu. Internat. CNRS (Versailles)
Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales
Edition de l'Institut national de la Recherche Agronomique, Paris. 1973
- DAVEY, M.R. und BUSH, E. (1974): Use of higher plant protoplasts in studies of symbiosis in vitro.
198 In: Abstracts, Demonstration, Leicester 1974
- DE JONG, D., JANSEN, E. und OLSEN, A. (1967): Oxidoreductive and hydrolytic enzyme patterns in plant suspension culture cell.
Exp. Cell Res. 47, 138-156
- DONN, G., HESS, D. und POTRYKUS, I. (1973): Wachstum und Differenzierung in aus isolierten Protoplasten und Petunia hybrida entstandenem Kallus.
Z. Pflanzenphysiol. Bd. 69, 423-437
- DURAND, J., POTRYKUS, I. und DONN, G. (1973): Plantes issues de protoplastes de Petunia.
Z. Pflanzenphysiol. 69, 26-34
- EARLE, D.E. und TORREY, J.G. (1965): Colony formation by isolated Convolvulus cells plated on defined media.
Plant Physiol. 40, 520-528
- ENZMANN-BECKER, G. (1973): Plating efficiency of protoplasts of tobacco in different light conditions.
Z. Naturforschung 28c, 470-471
- ERIKSSON, T. (1965): Studies on the growth requirements and growth measurements of cell cultures of Haplopappus gracilis.
Physiologia Pl. 18, 976-993

- ERIKSSON, T. und JONASSON, K. (1969): Nuclear division in isolated protoplasts from cells of higher plants grown in vitro.
Planta 89, 85-89
- ERIKSSON, T. (1970): Isolation and fusion pf plant protoplasts.
Colloq. Int. Cent. Natl. Rech.Sci. (Paris) 193, 297-302
- ERIKSSON, T., BONNET, H., GLIMELIUS, K. und WALLIN, A. (1974): Technical advances in protoplast isolation, culture and fusion.
In Tissue Culture and Plant Science 1974, ed.H.Street
3rd Int. Congress of Plant Tissue and Cell Culture
- EVANS, P.K., KEATES, A.G. imd COCKING, E.C.(1972): Isolation of protoplasts from cerea leaves.
Planta (Berl), 104, 178-181
- EVANS, P.K., WOODCOOK, J. und KEATES, A.G.: Steps towards cell fusion: Studés on cereal protoplasts and protoplasts of haploid tabacco. pp. 469-477. In: Colloq. Internat. CNRS (Versailles) Editions de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Paris. 1973
- FERRARI, T.E., PALMER, J.E. und WIDHOLM, J. (1975): Monitoring protoplast production from plant cells.
Plant Sci. Let. 4, 145-147
- FOWKE, L.C., BECH-HANSEN, C.W., GAMBORG, O.L. und SHYLUK, J.P. (1972)Electron microscopic observations on cultured cells and protoplasts of Ammi visnaga.
Am. J. Bot. 60, 304-312
- FREARSON, E.M., POWER, J.B. und COCKING, E.C. (1973) : The isolation and culture of Petunia leaf protoplasts.
Devel. Biology 33 (in press)
- FOWKE, L.C., BECH-HANSEN, C.W. und GAMBORG, O.L. (1974): Electron microscopic obeservations of cell regeneration from cultured protoplasts of Ammi visnaga.
Protoplasma 79, 235-248
- FOWKE, L.C., BECH-HANSEN, E.W., CONSTABEL, F. und GAMBORG, O.L. (1974): A comparative study on ultrastructure of cultured cells and protoplasts of Soybean during cell division.
Protoplasma 81, 189-203
- FREARSON, E.M., POWER, J.B. und COCKING, E.C.(1973): The isolation and culture of Petunia leaf protoplasts.
Devel. Biology 33, 130-137
- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A. und OJIMA, K. (1968): Nutrient requirements of suspension cultures of Soybean root cells.
Exp. Cell Res. 50, 151-158

- GAMBORG, O.L., KAO, K.N., MILLER, R.A., FOWKE, L.C. und CONSTABEL, F.: Cell regeneration, division and plant development from protoplasts. pp. 155-173. In: Colloq. Internat. CNRS (Versailles) Editions de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Paris. 1973
- GAMBORG, O.L. und MILLER, R.A. (1973): Isolation, culture, and uses of plant protoplasts. Can. J. Bot. 51, 1795-1799
- GAUTHERET, R.J. (1939): Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissu de tubercules de carotte. C.r.hebd. Sénac. Acad.Sci., Paris 208, 118-121
- GAUTHERET, R.J. (1966): Factors affecting differentiation of plant tissues grown in vitro. pp. 55-71. In: Cell Differentiation and Morphogenesis. Ed. W. Beermann. North Holland publ.Co.
- GIGOT, C., SCHMITT, C. und HIRTH, L.: Modifications ultrastructurales observées au cours de la préparation de protoplastes a partir de cultures de tissus de tabac. pp. 65-77 In: Colloq. Internat. CNRS (Versailles) Editions de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Paris. 1973
- GILES, K.L. (1972): An interspecific aggregate cell capable of cell wall regeneration. Plant, Cell Physiol. 13, 207-210
- GILES, K.L.: Attempts to demonstrate genetic complementation by the technique of protoplast fusion. pp. 485-495 In: Colloq. Internat. CNRS (Versailles) Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales Editions de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Paris. 1973
- GLMIELIUS, K., WALLIN, A. und ERIKSSON, T. (1974): Agglutinating effects of concanavalin A on isolated protoplasts of *Dacus carota*. Physiol. Plant. 31, 225-230
- GLEBA, Y.Y., SHVYDKAYA, L.G., BUTENKO, R.G. und SYTNIK, K.M. (1974): Cultivation of isolated protoplasts. Sow.Plant. Physiol. 21, 486-492
- GOSCH, G., BAJAJ, Y.P. und REINERT, J. (1975): Isolation, culture and fusion studies on protoplasts from different species. Protoplasma (in press)
- GRANT, M.E. und FULLER, K.W. (1968): Tissue culture of root cell of *Vicia faba*. J. exp. Bot. 19, 667-680

- GRAMBOW, H.J., KAO, K.N., MILLER, R.A., und GAMBORG, O.L. (1972):
Cell division and plant development from protoplasts
of cell suspension cultures.
Planta 103, 348-355
- GREENWAY, H. (1970): Effects of slowly permeating osmotica on
metabolism of vacuolated and nonvacuolated tissues.
Plant. Physiol. 46, 254-258
- GREGORY, D.W. und COCKING, E.C. (1965): The large-scale isolation
of protoplasts from immature tomato fruits.
J. Cell. Biol. 24, 143-146
- GREGORY, D.W. und COCKING, E.C. (1966): Studies on isolated
protoplasts and Vacuoles.
J. Experimental Bot. 17, No. 50, 57-67
- GROUT, B.W.W., WILLISON, J.H.M. und COCKING, E.C. (1972): Interactions
at the surface of plant cell protoplasts:
an electrophoretic and freeze-etch study.
J. Bioenergetics 4, 585-602
- HABERLANDT, G. (1902): Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen.
Sber. Akad. Wiss. Wien 111, 69-92
- HALL, M.D. und COCKING, E.C. (1971): The bursting response of
isolated *Avena* coleoptile protoplasts to indol-3yl-
acetic acid. *Biochem. J.* 124-133
- HALPERIN, W. (1969): Morphogenesis in cell cultures.
Ann. Rev. Plant Physiol. 20, 395-418
- HALPERIN, W. und WETHERELL, D.F. (1965): Ontogeny of adventive
embryos of wild carrot.
Science 147, 756-758
- HANKE, D.E. und NORTHCOTE, D.H. (1974): Cell wall formation by
Soybean callus protoplasts.
J. Cell. Sci. 14, 29-50
- HARADA, H. (1973): A new method for obtaining protoplasts from
mesophyll cells.
Z. Pflanzenphysiol. 69, 77-80
- HELLMANN, S., und REINERT, J. (1971): Protoplasten aus Zellkulturen
von *Daucus carota*.
Protoplasma 72, 479-484
- HESS, D. (1973): Die Aufnahme von FITC und FITC-Serumalbumin in
isolierte Protoplasten von *Petunia hybrida*.
Z. Pflanzenphysiol. Bd. 69, 280-286
- HESS, D. und ENDRESS, R. (1973): Anthocyansynthese in isolierten
Protoplasten von *Nemesia strumosa* var. *Feuerkönig*.
Z. Pflanzenphysiol. Bd. 68, 441- 449

- HESS, D. und POTRYKUS, I (1972): Teilung isolierter Protoplasten von *Petunia hybrida*.
Naturwissenschaften 59, 273-274
- HESS, D., POTRYKUS, I., DONN, G., DURAND, J. und HOFFMANN, F.: Transformations experiments in higher plants: Pre-requisites for the use of isolated protoplasts (Isolation from mesophyll and callus cultures, uptake of protein and DNA, and regeneration of whole plants). pp. 345-351 In: Colloq. Internat. CNRS (Versailles) Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales.
Edition de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Paris. 1973
- HEYN, R.F. und SCHILPEROORT, R.A.: The use of protoplasts to follow the fate of *Agrobacterium tumefaciens* DNA on incubation with tobacco cells.
pp. 385-396 In: Colloq. Internat. CNRS (Versailles) Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales.
Edition de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Paris. 1973
- HILDEBRANDT, A.C. und SCHENK, R.U. (1968): Production of protoplasts from plant cells in liquid culture using purified commercial cellulases.
Crop. Sci. 9, 155-166
- HILLER, R.G. und GREENWAY, H. (1968): Effects of low water potentials on some aspects of carbohydrate metabolism in *Chlorella pyrenoidosa*.
Planta 78: 49-59
- HOFFMANN, F. (1973): Die Aufnahme doppelt-markierter DNS in isolierte Protoplasten von *Petunia hybrida*.
Z. Pflanzenphysiol. 69, 249-261
- HOLL, F.B., GAMBORG, O.L. und OHYAMA, K.: Genetic Transformation in plants.
In: Abstracts: Plenary papers, concurrent papers, Leicester 1974
- HORINE, R.K. und RUESINK, A.W. (1972): Cell wall regeneration around protoplasts isolated from *Convolvulus* tissue culture.
Plant Physiol. 50, 438-445
- HRICOVÁ, D., STRMEŇ, J. und BAUER, S.: Formation of protoplasts from the spruce tissue culture (*Picea excelsa* Link).
In: Abstracts: Demonstration, Leicester 1974
- ITO, M. (1973a): Studies on the behavior of meiotic protoplasts I. Isolation from microsporocytes of liliaceous plants.
Bot. Mag. Tokyo 86, 133-141

- ITO, M. (1973b): Studies on the behavior of meiotic protoplasts II. Induction of a high fusion frequency in protoplasts from liliaceous plants.
Plant & Cell Physiol. 14, 865-872
- ITO, M. und MAEDA, M. (1973): Fusion of meiotic protoplasts in liliaceous plants.
Exptl. Cell res. 80, 453-456
- ITO, M. und MADEA, M. (1974): Meiotic division and fusion of nuclei in multinucleate cells from the induced fusion of meiotic protoplasts of liliaceous plants.
Bot. Mag. Tokyo 87, 219-228
- JONES, R.L., ARMSTRONG, J.E. und TAIZ, L.: Barley aleurone protoplasts: some observations on their structure and physiology.
pp. 109-117 In: Colloq. Internat. CNRS (Versailles) Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales.
Edition de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Paris. 1973
- KAMEYA, T. (1973): The effects of gelatin on Aggregation of protoplasts from higher plants.
Planta (Berl.) 115, 77-82
- KAMEYA, T. und UCHIMIYA, H. (1972): Embryoids derived from isolated protoplasts of carrot.
Planta (Berl.) 103, 356-360
- KANAI, R. und EDWARDS, G.E. (1973): Separation of mesophyll protoplasts and bundle sheath cells from maize leaves for photosynthetic studies.
Plant Physiol. 51, 1133-1137
- KANAI, R. und EDWARDS, G.E. (1973): Purification of enzymatically isolated mesophyll protoplasts from *C4* and Crassulacean acid metabolism plants using an aqueous dextran polyethylene glycol two-phase system.
Plant Physiol. 52, 484-490
- KAO, K.N., GAMBORG, O.L., MILLER, R.A. und KELLER, W.A. (1971): Cell divisions in cells regenerated from protoplasts of Soybean and *Haplopappus gracilis*.
Nature (Lond.) 232, 124
- KAO, K.N., KELLER, W.A. und MILLER, R.A. (1970): Cell division in newly formed cells from protoplasts of Soybean.
Exp. Cell Res. 62, 231-236
- KAO, K.N., GAMBORG, O.L., MICHAYLUK, M. und MILLER, R.A.: Effects of sugars and inorganic salts on cell regeneration and sustained division in plant protoplasts.
pp. 207-213 In: Colloq. Internat. CNRS (Versailles) Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales
Edition de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Paris. 1973

- KAO, K.N. und MICHAYLUK, M.R. (1974): A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta* (Berl.) 115, 355-367
- KAO, K.N., CONSTABEL, F., MICHAYLUK, M.R. und GAMBORG, O.L. (1974): Plant protoplast fusion and growth of intergeneric hybrid cells. *Planta* (Berl.) 120, 227-245
- KARTHA, K.K., MICHAYLUK, M.R., KAO, K.N., GAMBORG, O.L. und CONSTABEL (1974): Callus formation and plant regeneration from mesophyll protoplasts of rape plants (*Brassica napus* L.) *Plant Sci. Lett.* 3, 265-271
- KARTHA, K.K., GAMBORG, O.L., CONSTABEL, F. und KAO, K.N. (1974): Fusion of rapeseed and Soybean protoplasts and subsequent division of heterokaryocytes. *Can. J. Bot.* 52, 2435-2436
- KELLER, W.A., HARVEY, B., GAMBORG, O.L., MILLER, R.A. und EVELEIGH, D.E. (1970): Plant protoplasts for use in somatic cell hybridization. *Nature* (Lond.) 226, 280-282
- KELLER, W.A., HARVEY, L.B., KAO, K.N., MILLER, R.A. und GAMBORG, O.L.: Determination of the frequency of interspecific protoplast fusion by differential staining. pp. 456-463 In: *Colloq. Intern. CNRS (Versailles) Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales* Edition de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Paris. 1973
- KELLER, W.A. und MELCHERS, G. (1973): The effect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion. *Z. Naturforsch.* 28c, 737-741
- KING, P.J. und STREET, H.E.: Growth patterns in cell cultures In: *Plant and tissue and cell culture* Botanical monographs vol. 11 edited by H.E. Street Blackwell Scientific Publications
- KLERCKER, J.A.F. (1892): Eine Methode zur Isolierung lebender Protoplasten. *Svenka. Vet.Akad. Forh. Stockholm* 9, 463-471
- KÜSTER, E. (1909): Über die Verschmelzung nackter Protoplasten. *Ber. Bot. Ges.* 27, 589-598

- LAMPOR, D.T.A.: Is the primary cell wall a protein-glycan network.
pp. 27-31 In: Colloq. Internat. CNRS (Versailles)
Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales
Editions de la 1'Institut de la Recherche
Agronomique, Paris. 1973
- LEDOUX, L., HUART, R. und JACOBS, M. (1971): Fate of exogenous DNA in *Arabidopsis thaliana*. Evidence for replication and preliminary results at the biological level.
In: Informative molecules in biological systems.
Edited by L.G.H. Ledoux. North Holland Publ.Co.,
pp. 159-177
- LIAU, D.F. und BOLL, W. (1971): Growth and patterns of growth and division in cell suspension cultures of bush bean.
Can. J. Bot. 49, 1131-1139
- MACKENZIE, I.A. und STREET, H.E. (1970): Studies on the growth in culture of plant cells. VIII. The production of ethylene by suspension cultures of *Acer pseudoplatanus* L.
J. exp. Bot. 21, 824 - 834
- MACKENZIE, I.A., BUI-DANG-HA, D. und DAVEY, M.R.: Some aspects of the isolation, fine structure and growth of protoplasts from *Asparagus officinalis* L.
pp. 291-300 In: Colloq. Internat. CNRS (Versailles)
Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales
Edition de l'Institut National de la Recherche
Agronomique, Paris. 1973
- MÄDER, M, MEYER, Y. und BOPP, M. (1975): Lokalisation der Peroxidase-Isoenzyme in Protoplasten und Zellwänden von *Nicotiana tabacum* L.
Planta (Berl.) 122, 259-268
- MANDELS, M. und REESE, E.T. (1965):
Ann Rev. Phytopathol. 3.85
- MARETZKI, A., THOM, M. und NICKELL, L.G.: The effect of osmotic stress on cell cultures of sugarcane.
pp. 140 In: Abstract of paper presented at XI International Botanical Congress. 1969
- MARETZKI, A. und NICKELL, L.G.: Formation of protoplasts from sugarcane cell suspensions and the regeneration of cell cultures from protoplasts.
pp. 51-63 In: Colloq. Internat. CNRS (Versailles)
Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales.
Edition de l'Institut National de la Recherche
Agronomique, Paris. 1973
- MAYO, M.A. und COCKING, E.C. (1969): Detection of pinocytotic activity using selective staining with phosphotungstic acid.
Protoplasma 68, 231-236

- MESSERSCHMIDT, M. (1974): Kallusbildung und Differenzierung aus isolierten Protoplasten von *Pharbitis nil*.
Z. Pflanzenphysiol. Bd. 74, 175-178
- MEYER, Y. (1974): Isolation and culture of tobacco mesophyll protoplasts using a saline medium.
Protoplasma 81, 363-372
- MEYER, Y. und ABEL, W.O. (1975): Importance of the wall for cell division and in the activity of the cytoplasm in cultured tobacco protoplasts.
Planta (Berl.) 123, 33-40
- MEYER-TEUTER, H. (1972): Korrelationen zwischen Wachstum und Morphogenese bei Gewebekulturen von *Daucus carota*.
(Dissertationsarbeit)
- MEYER-TEUTER, H. und REINERT, J. (1973): Correlation between rate of cell division and loss of embryogenesis in longterm tissue cultures.
Protoplasma 78, 273-283
- MILLER, R.A., GAMBORG, O.L., KELLER, W.A. und KAO, K.N. (1971): Fusion and division of nuclei in multinucleated Soybean protoplasts.
Can. J. Genet. Cytol., 13, 347-353
- MOTOYOSHI, F. (1971): Protoplasts isolated from callus cells of maize endosperm. Formation of multinucleate protoplasts and nuclear division.
Exptl. Cell. Res. 68, 452-456
- MURASHIGE, T. und NAKANO, R.: Tissue cultures as a potential tool obtaining polyploid plants.
J. Heredity 57, 115-118
- MURASHIGE, T. und SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures.
Physiol. Plantarum (KbH) 15, 473-497
- NASH, D. und DAVIES, M. (1972): Some aspects of growth and metabolism of Paul's Scarlet Rose cell suspensions.
J. exp. Bot. 23, 75 - 91
- NAGATA, T. und TAKEBE, I. (1970): Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium.
Planta 99, 12-20
- NAGATA, T. und YAMAKI, T. (1973): Electron microscopy of isolated tobacco mesophyll protoplasts cultured in vitro.
Z. Pflanzenphysiol. 70, 452-459
- NEVINS, D.J. (1964): Changes in cell wall polysaccharides associated with growth.
Plant Physiol. 43, 914-922

- NICKELL, L.G. und TORREY, J.G. (1969): Crop improvement through plant cell and tissue culture.
Science 166, 1068-1070
- NITSCH, J.P. und OHYAMA, K. (1971): Obtention de plantes à partir de protoplastes haploïdes cultivés in vitro.
C.R. Acad. Sci. (Paris) Ser.D. 273, 801-804
- OHYAMA, K., GAMBORG, O.L. und MILLER, R.A. (1972): Uptake of exogenous DNA by plant protoplasts.
Can. J. Bot. 50, 2077-2080
- OHYAMA, K. und NITSCH, J.P. (1972): Flowering haploid plants obtained from protoplasts of tobacco leaves.
Plant & Cell Physiol. 13, 229-236
- OTSUKI, Y. und TAKEBE, I. (1969): Isolation of intact mesophyll cells and their protoplasts from higher plants.
Pl. Cell Physiol. 10, 917-921
- OTSUKI, Y., TAKEBE, I., HONDA, Y. und MATSUI, C. (1972): Ultrastructure of infection of tobacco mesophyll protoplasts by tobacco mosaic virus. Virology 49, 188-194
- PARTANEN, C.R. (1963): Plant tissue culture in relation to developmental cytology.
Int. Rev. Cytol. 15, 215-243
- PELCHER, L.F., GAMBORG, O.L. und KAO, K.N. (1974): Bean mesophyll protoplasts: production, culture and callus formation.
Plant Science Letters, 3, 107-111
- PEARCE, R. (1972): Culture of isolated higher plant protoplasts.
Ph.D. Thesis, University of Nottingham, England.
In: Plant tissue and cell culture. Edited by H.E. STREET
Blackwell Scientific Publications 1973
- PILET, P.E. (1971b): Effects de quelques auxins sur les protoplastes racinaires.
C.R. Acad. Sc., 271, 300-303
- PILET, P.E.: Transaminase activity in root protoplasts enzymatically and mechanically prepared.
pp. 99-107 In: Colloq. Internat. CNRS (Versailles)
Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales
Edition de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Paris. 1973
- PILET, P.E., PRAT, R. und ROLAND, J.-C. (1972): Morphology, RNase and transaminase of root protoplasts.
Plant & Cell Physiol. 13, 297-309
- PINTO DA SILVA, P.-G. (1969): Isolation of protoplasts from higher plant cells.
Naturw. 56, 41

- POIRIER-HAMON, S., und HARADA, H.: Organ differentiation from the culture of mesophyll protoplasts of *Antirrhinum majus*.
In: Abstracts: Demonstration, Leicester 1974
- POJNAR, E., WILLISON, J.H.M. und COCKING, E.C. (1967): Cell wall regeneration by isolated tomato fruit protoplasts.
Protoplasma 64, 460-475
- POTRYKUS, I. (1971): Inter and interspecific fusion of protoplasts of petals of *Torenia baillonii* and *Torenia fourieri*.
Nature New Biol. 231, 57-58
- POTRYKUS, I. und DURAND, J. (1972): Callus formation from single protoplasts of *Petunia*.
Nature New Biol. 237, 286-287
- POTRYKUS, I. (1973): Transplantation of chloroplasts into protoplasts of *Petunia*.
Z. Pflanzenphysiol., 70, 364-366
- POTRYKUS, I. (1971): Fusion von Protoplasten mit gut sichtbaren Kernen.
Naturwissenschaften 58, 328
- POTRYKUS, I. (1972): Fusion of differentiated protoplasts.
Phytomorphology 22, 91-96
- POTRYKUS, I. und HOFFMANN, F. (1973): Transplantation of nuclei into protoplasts of higher plants.
Z. Pflanzenphysiol. 69, 287-289
- POWER, J.B. und COCKING, E.C. (1968): A simple method for the isolation of very large numbers of leaf protoplasts by using mixtures of cellulase and pectinase.
Biochem. J. 3 (5) 33
- POWER, J.B. und COCKING, E.C. (1970): Isolation of leaf protoplasts macromolecule uptake and growth substance response.
J. exp. Bot. 21, 64-70
- POWER, J.B. und COCKING, E.C. (1971): Fusion of plant protoplasts.
Sci. Progr. Oxford, 59, 181-198
- POWER, J.B., CUMMINS, S.E. und COCKING, E.C. (1970): Fusion of isolated plant protoplasts.
Nature (Lond.) 225, 1016-1018
- POWER, J.B. und FREARSON, E.M.: The inter- and intraspecific fusion of plant protoplasts, subsequent developments in culture, with reference to crown gall callus and tobacco and petunia leaf system.
pp. 409-421 In: Colloq. Internat. CNRS (Versailles)
Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales
Edition de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Paris. 1973

- POWER, J.B., FREARSON, E.M. und COCKING, E.C. (1971): The preparation and culture of spontaneously fused tobacco leaf spongy-mesophyll protoplasts.
Proc. Biochem. J- 123, 29-30
- PRAT, R. (1973): Contribution à l'étude des protoplastes végétaux II. Ultrastructure du protoplaste isolé et régénération de sa paroi.
J. Microscopie. 18, 65-86
- PRAT, R. und ROLAND, J.C. (1971): Etude ultrastructurale des premiers stades de néoformation d'une enveloppe par des protoplastes végétaux séparés mécaniquement de leur paroi.
C.R. Acad. Sc. Paris, 273, 165-168
- RAJ, B. und HERR, Jr, J.H. (1969): The isolation of protoplasts from the placental cells of *Solanum nigrum* L.
Protoplasma 69, 291-300
- RAJ, B. und HERR, Jr, J.H. (1973): Effects of hydrolytic enzymes on tomato protoplasts.
Österr. Bot. Z. 121, 65-72
- REINERT, J. (1958): Untersuchungen über die Morphogenese an Gewebekulturen.
Ber. dtsh. Bot. Ges. 71, 15
- REINERT, J. (1958): Morphogenese und ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Karotten.
Naturwiss. 45, 344-345
- REINERT, J. (1959): Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventivembryonen an Gewebekulturen aus Karotten.
Planta 53, 318-333
- REINERT, J. (1967): Some aspects of embryogenesis in somatic cells of *Daucus carota*.
Phytomorphology 17, 510-515
- REINERT, J. (1968): Morphogenese in Gewebe- und Zellkulturen.
Naturwiss. 55, 170-175
- REINERT, J.: Determination of embryo and root formation in tissue culture from *Daucus carota*.
pp. 261-268 In: Les cultures de tissus de plants.
CNRS, Paris. 1968
- REINERT, J. und v. ARDENNE, R. (1964): Abhängigkeit des Teilungswachstums isolierter Einzelzellen aus *Vitis vinifera* Kulturen von benachbarten wachsenden Geweben.
Zt. Naturfg. 19b, 1150-1156
- REINERT, J. und BACKS, D. (1968): Control of totipotency in plant cells growing in vitro.
Nature 220, 1340-1341

- REINERT, J., BACKS, D. und KROSING, M. (1966): Faktoren der Embryogenese in Gewebekulturen aus Kulturformen von Umbelliferen.
Planta (Berl.) 68, 378-675
- REINERT, J., BACKS-HÜSEMANN, D. und ZERBAN, H. (1970): Determination of embryo and root formation in tissue cultures from *Daucus carota*.
In: 2. Internat. Conf. Plant Tissue Culture, CNRS. Strasbourg
- REINERT, J. und HELLMANN, S.: Aspects of nuclear division and cell wall formation in protoplasts of different origin pp. 273-279 In: Colloq. Internat. CNRS (Versailles) Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales Edition de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Paris. 1973
- REINERT, J. und TAZAWA, M. (1969): Wirkungen von Stickstoffverbindungen und von Auxin auf die Embryogenese in Gewebekulturen.
Planta (Berl.) 87, 239-248
- REINERT, J. und TAZAWA, M. und SEMENOFF, S. (1967): Nitrogen compounds as factors of embryogenesis in vitro.
Nature 216, 1215-1216
- REESE, E.T. (1956):
Appl. Microbiol. 4, 39
- ROLAND, J.C. und PRAT, R.: Les protoplastes et quelques problèmes concernant le rôle et l'élaboration des parois. pp. 243-272 In: Colloq. Internat. CNRS (Versailles) Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales Edition de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, 1973
- RUESINK, A.W. (1971): The plasma membrane of *Avena coleoptile* protoplasts.
Plant Physiol. 47, 192-195
- RUESINK, A.W. (1971): Protoplasts of higher plant cells. In: A. San. Pietro. ed., Methods in Enzymology, Vol. 23, Academic Press, New York. pp. 197-208
- RUESINK, A.W.: Surface membrane properties of isolated protoplasts pp. 41-49 In: Colloq. Internat. CNRS (Versailles) Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales Edition de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, 1973
- RUESINK, A.W. und THIMANN, K.V. (1965): Protoplasts from *Avena coleoptile*.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 54, 56-64
- REINERT, J. und HELLMANN, S. (1971): Mechanism of the formation of polynuclear protoplasts from cells of higher plants
Naturw. 58, 419

- RUESINK, A.W. und THIMANN, K.V. (1966): Protoplasts: Preparation from higher plants.
Science 154, 196-199
- SCHENK, R.U. und HILDEBRANDT, A.C. (1969): Production of protoplasts from plant cells in liquid culture using purified commercial cellulases.
Crop. Sci. 9, 629-631
- SCHENK, R.U. und HILDEBRANDT, A.C. (1969): Osmotic and pH effects on production and survival of plant protoplasts.
Yton 26, 155-166
- SCHENK, R.U. und HILDEBRANDT, A.C. (1970): Production, manipulation and fusion of plant cell protoplasts as steps toward-somatic hybridization.
pp. 319-333 In: Colloq. Internat. CNRS N°193
Les cultures de tissus de plantes
- SCHIEDER, O. (1974): Selektion einer somatischen Hybride nach Fusion von Protoplasten auxotropher Mutanten von *Sphaerocarpos donnellii* Augst.
Z. Pflanzenphysiol. 74, 357-365
- SCHILDE-RENTSCHER, L. (1972): A simple method for the preparation of plant protoplasts.
Z. Naturforsch. 27b, 208-209
- SELBY, K.: The components of cell wall degrading enzymes with particular reference to the cellulases.
pp. 33-40 In: Colloq. Internat. CNRS (Versailles)
Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales
Edition de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Paris. 1973
- STREET, H.E. (1966): Growth, differentiation and organogenesis in plant tissue and organ cultures.
pp. 631-689, In: The Biology of Cells and Tissues in Culture. Vol. 3, Ed. E.N. Willmer. Academic press, New York
- STREET, H.E.: Plant Tissue and Cell Culture.
Botanical monographs Volume 11
Edited by Street, H.E., Blackwell Scientific Publication 1973
- STUART, R. und STREET, H.E. (1969): Studies on growth in culture of plant cells. IV. The initiation of division in suspensions of stationary phase cells of *Acer pseudoplatanus*. L.
J. exp. Bot. 20, 556-571
- SYONO, K. (1965): Changes in organ forming capacity of carrot root callus during subcultures.
Pl. Cell Physiol. 6, 403-419
- TAIZ, L. und JONES, R.L. (1971): The isolation of barley-aleurone protoplasts.
Planta 101, 95-100

- TAKEBE, I., LABIB, G. und MELCHERS, G.: Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. *Naturwissenschaften* 58, 318-320 (1971)
- TAKEBE, I. und NAGATA, T.: Culture of isolated tobacco mesophyll protoplasts.
pp. 175-188 In: *Colloq. Internat. CNRS (Versailles)*
Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales
Edition de l'Institut de la Recherche National
Agronomique, Paris 1973
- TAKEBE, I. und OTSUKI, Y. (1969): Infection of tobacco mesophyll protoplasts by tobacco mosaic virus.
Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 64, 843-848
- TAKEBE, I. und OTSUKI, Y.: Multiple infection of tobacco mesophyll protoplasts by plant viruses.
In: *Abstracts: Plenary papers, concurrent papers.*
Leicester 1974
- TAKEBE, I., OTSUKI, Y. und AOKI, S. (1968): Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state.
Plant & Cell Physiol. 9, 115-124
- TAKEBE, I., OTSUKI, Y. und AOKI, S. (1971): Infection of isolated tobacco mesophyll protoplasts by tobacco mosaic virus.
pp. 503-511 In: *Colloq. Internat. CNRS N°193*, Paris
- TAKEBE, I. und OTSUKI, Y. (1973): Fine structure of isolated mesophyll protoplasts of tobacco.
Planta (Berl.) 113, 21-27
- TORREY, J. G. und REINERT, J. (1961): Suspension culture of higher plant cells in synthetic medium.
Pl. Physiol., Lancaster, 36, 483-491
- TORREY, J., REINERT, J. und MERKEL, N. (1962): Mitosis in suspension cultures of higher plant cells in synthetic medium.
Am. J. Bot. 49, 420-425
- UCHIMIYA, H. und MURASHIGE, T. (1974): Evaluation of parameters in the isolation of viable protoplasts from cultured tobacco cells.
Plant. Physiol. 54, 936-944
- USUI, H., MAEDA, M. und ITO, M. (1974): High frequency of spontaneous fusion in protoplasts from various plant tissues.
Bot. Mag. Tokyo 87, 179-182
- USUI, H. und TAKEBE, I. (1969): Division and growth of single mesophyll cells isolated enzymatically from tobacco leaves.
Develop. Growth and Diff. 11, 143-151

- VASIL, V., HILDEBRANDT, A.C. und RIKER, A.J. (1964): Plantlets from free suspended cells and cell groups in vitro. Science N.Y. 146, 76-77
- VASIL, V., und VASIL, I.K.: Growth and cell division in isolated plant protoplasts in microchambers. pp. 139-149 In: Colloq. Internat. CNRS (Versailles) Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales Edition de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Paris. 1973
- VASIL, V. und VASIL, I.K.: Isolation and culture of protoplasts of corn, petunia and tobacco. In: Abstracts: Plenary papers, concurrent papers. Leicester 1974
- VERMA, D. und van HUSTEE, R. (1970): Cellular differentiation and peroxidase isozymes in cell cultures of peanut cotyledons. Can. J. Bot. 48, 429-431
- WALLIN, A. und ERIKSSON, T. (1973): Protoplast culture from cell suspension of *Daucus carota*. Physiol. Plant. 28, 33-39
- WALLIN, A. und ERIKSSON, T.: Plating of protoplasts from cell suspension cultures of *Daucus carota*. pp. 301-307 In: Colloq. Internat. CNRS. (Versailles) Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales. Edition de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, 1973
- WALLIN, A., GLIMELIUS, K. und ERIKSSON, T. (1974): The induction of aggregation and fusion of *Daucus carota* protoplasts by Polyethylene glycol. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 74, 64-80
- WALLIN, A., GLIMELIUS, K. und ERIKSSON, T.: Effects of polyethylene glycol on aggregation and fusion of *daucus carota*. In: Abstracts, Demonstration, Leicester 1974
- WATTS, J.W., MOTOYOSHI, F. und KING, J.M. (1974): Problems associated with the production of stable protoplasts of cells of tobacco mesophyll. Ann. Bot. 38, 667-671
- WENZEL, G. und SCHIEDER, O. (1973): Regeneration of isolated protoplasts from Nicotinic acid-deficient mutants of the liverwort *Sphaerocarpos donnelli* Augst. Plant. Sci. Lett. 1, 421-423
- WHITE, P.R. (1934): Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. Pl. Physiol., Lancaster 9, 585-600

- WHITE, P.R. (1954): The cultivation of animal and plant cell.
Roland Press. New York
- WILLISON, L.A. und WITHERS, L.A.: The fine structure of cultured protoplasts.
In: Abstracts, Demonstration, Leicester 1974
- WITHERS, L.A. und NAG, K.K.: The ultrastructure plant cells.
In: Abstracts: Demonstration, Leicester 1974
- WILLISON, J.H.M. und COCKING, E.C. (1972): The production of microfibrils at the surface of isolated tomato fruit protoplasts.
Protoplasma 75, 397-403
- WILLISON, J.H.M., GROUT, B.W.W. und COCKING, E.C. (1971):
A mechanism for the pinocytosis of latex spheres by tomato fruit protoplasts.
J. Bioenergetics 2, 371-382
- WILLISON, J.H.M.: Fine structural changes occurring during the culture of isolated tomato fruit protoplasts.
pp. 215-241 In: Colloque Internat. CNRS (Versailles)
Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales
Edition de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Paris. 1973
- WITHERS, L.A.: Plant protoplast fusion: methods and mechanism.
pp. 517-545 In: Colloq. Internat. CNRS (Versailles)
Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales
Edition de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Paris. 1973
- WITHERS, L. und COCKING, E.C. (1972): Fine structural studies on spontaneous and induced fusion of higher plant protoplasts.
J. Cell. Sci. 11, 59-75
- YEOMAN, M.M.: Division Synchrony in cultured cells.
pp. 1-17 In: Tissue culture and plant science 1974
edited by H.E. Street, Leicester 1974
- YEOMAN, M.M. und STREET, H.E.: General cytology of cultured cells.
pp. 121 - 160 In: Plant Tissue and Cell Culture
Botanical Monographs Vol. 11
Blackwell Scientific Publications 1973
- ZAITLIN, M. und BEACHY, R.N.: Protoplasts and separated cells: some new vistas for plant virology.
In: Abstracts: Plenary papers, concurrent papers.
Leicester

Die vorliegende Arbeit wurde in den Jahren 1970 bis 1975 in der WE Botanik II (Institut für Pflanzenphysiologie und Zellbiologie) des Fachbereiches 23 (Biologie) der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. J. Reinert möchte ich für die Überlassung des Themas und für sein Interesse am Fortgang der Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. H.J. Küster danke ich für kritische Hinweise und anregende Diskussionen.

L e b e n s l a u f

Am 25. April 1942 wurde ich als einziges Kind des Ingenieurs Igor Semenoff und seiner Ehefrau Ludmilla Semenoff, geb. Kauffmann in Berlin geboren.

Von 1948 bis 1954 besuchte ich die Grundschule, anschließend die Eckener-Schule, Oberschule wissenschaftlichen Zweiges in Berlin - Tempelhof, wo ich im März 1961 die Reifeprüfung bestand.

Im Sommersemester 1961 ließ ich mich an der Freien Universität Berlin für das Fach Biologie immatrikulieren.

Nach dem Vordiplom im November 1965 fing ich meine Diplomarbeit mit dem Thema "Faktoren der Embryogenese in Gewebekulturen" an.

Zum Wintersemester 1966 wurde ich als wissenschaftliche Hilfsassistentin am Pflanzenphysiologischen Institut eingestellt.

Die Diplomprüfung legte ich im März 1969 ab.

Im Oktober 1969 erhielt ich die Stelle einer wissenschaftlichen Assistentin im Institut für Pflanzenphysiologie und Zellbiologie und konnte unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. J. Reinert mit den Untersuchungen zu der vorliegenden Dissertation beginnen.

